

**LA PROTEÍNA MAP4K3 PARTICIPA, A TRAVÉS
DE MECANISMOS INDEPENDIENTES, EN LA
REGULACIÓN DE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN
TOR Y JNK**

TESIS DOCTORAL

MARTÍN DIEGO RESNIK DOCAMPO

Universidad Autónoma de Madrid

**MEMORIA PRESENTADA POR EL LICENCIADO
MARTÍN DIEGO RESNIK DOCAMPO
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**DIRECTOR DE LA TESIS:
Dr. JOSÉ FÉLIX DE CELIS IBEAS**

**MARTÍN DIEGO RESNIK DOCAMPO
MAYO 2011**

**Este trabajo ha sido realizado en el
Departamento de Biología Molecular;
Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”
(C.S.I.C – U.A.M)**

A Ana y a mis Padres

SUMMARY

The formation of organs with a characteristic pattern, size and form requires a strict genetic control of cellular growth, cell proliferation, cell differentiation and cell death. *Drosophila melanogaster* is a convenient model system to analyze gene function during development, because it allows to manipulate gene activity and to assign specific functions to the relevant genes. Our main objective was to identify the signaling pathways affected by the gene *CG7097* (*happyhour*) during the development of the *Drosophila* wing. *CG7097* encodes the *Drosophila* orthologous of the MAP4K3 protein, a conserved Ser/Thr kinase of the Ste20 kinase superfamily. Using loss-of-function mutants and over-expression conditions of the gene we find that MAP4K3 levels affect cell growth and viability. These requirements are related to the modulation of the TORC1 and JNK signalling pathways by MAP4K3, and are best detected when the larvae grow in a medium with low protein concentration or are exposed to irradiation. We also find that MAP4K3 display strong genetic interactions with different components of the InR/TOR signalling pathway, and can interact directly with the GTPases RagA and RagC and with the multi-domain kinase Tor. We suggest that MAP4K3 has two independent functions during wing development, one related to the activation of the JNK pathway in response to stress and other in the assembling or activation of the TORC1 complex, being critical to modulate cellular responses to changes in nutrient availability.

ÍNDICE

I.INTRODUCCIÓN	17
1.-La biología del desarrollo	19
2.- <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo	19
3.-Desarrollo de los discos imaginales	20
4.-El disco imaginal de ala	23
5.-Control del crecimiento	25
6.-Control de la supervivencia celular	29
7.-El disco imaginal como sistema de identificación génica	32
8.-Identificación y caracterización de un gen implicado en el crecimiento del ala	32
II. OBJETIVOS	35
III. MATERIALES Y MÉTODOS	39
1.-Cultivo de <i>Drosophila</i>	41
2.-Estirpes de <i>Drosophila</i>	42
3.-Técnicas genéticas e histológicas	42
3.1.-Generación de alelos de falta de función	42
3.2.-Hibridación “ <i>in situ</i> ”	43
3.3.-Inmunohistoquímica	43
3.4.-Preparación de alas adultas	44
3.5.-Cuantificación del tamaño de ala, y del número y tamaño de sus células	44
3.6.- Cálculo del índice mitótico de discos imaginales	44
4.-Técnicas de Biología Molecular	44
4.1.-Generación de individuos transgénicos	44
4.2.-Mapeo molecular de las mutaciones inducidas en el gen <i>Map4k3</i>	45
4.3.-Generación de anticuerpo	46
4.4.-RT-PCR cuantitativa	47

5.-Técnicas Bioquímicas	47
5.1.-Ensayos de interacción <i>In vitro</i>	47
5.2.-Western Blot	47
6.-Transfección de células S2	48
7.-Análisis del ciclo celular por citometría de flujo	49
8.-Experimentos de irradiación	49
9.-Peso de <i>Drosophila</i>	49
10.-Análisis estadístico	50
IV. RESULTADOS	53
1.-Identificación del gen <i>CG7097</i>	57
1.1.-Fenotipo de combinaciones <i>Gal4/EP-704</i>	57
1.2.-Identificación del gen responsable del fenotipo de sobre-expresión	60
1.3.-Características moleculares de <i>CG7097</i>	62
1.4.-Descripción del desarrollo del fenotipo de sobre-expresión de MAP4K3	66
1.5.-Posible relación con JNK e InR/TOR	70
2.-Relación fenotípica de MAP4K3 con las vías de señalización TOR y JNK	72
2.1.-Fenotipos por manipulación de la vía InR/TOR	72
2.2.-Fenotipos por manipulación de la vía JNK	77
2.3.-Interacciones genéticas y bioquímicas de MAP4K3 con InR/TOR	79
2.3a.-Interacciones genéticas	79

2.3b.-Experimentos de interacción bioquímica con miembros del complejo TORC1	92
2.4.-Interacciones genéticas de MAP4K3 con la ruta de señalización-JNK	93
3.-Generación y análisis de condiciones de falta de función de MAP4K3	94
3.1.-Reducción de los niveles de expresión de MAP4K3 mediante ARNi	94
3.2.-La línea <i>EP-704</i> como mutante	95
3.3.-Generación y análisis de mutantes de falta de función para el gen <i>Map4k3</i>	96
3.4.-Estudio de la falta de función en condiciones ambientales de estrés para JNK y TOR	99
3.4a.-Condiciones de estrés nutricional	99
3.4b.-Condiciones de estrés generalizado	100
V. DISCUSIÓN	103
1.-Identificación del gen <i>CG7097</i> como responsable del fenotipo de sobre-expresión de la línea <i>EP-704</i>	105
2.-Localización subcelular de la proteína MAP4K3	106
3.-Funciones independientes de MAP4K3 en las rutas TOR y JNK	107
4.-Relación de la ganancia y la falta de función de MAP4K3 con la ruta TOR	108
5.-Relación de la ganancia y la falta de función de MAP4K3 con la ruta JNK	110
6.-Papel de MAP4K3 bajo situaciones de estrés	110
VI. CONCLUSIONES	115

	VII. BIBLIOGRAFÍA	121
	VII. AGRADECIMIENTOS	137
	IX. ANEXO	145

I. INTRODUCCIÓN

1.- LA BIOLOGÍA DEL DESARROLLO

Cada organismo pluricelular se origina a partir de un cigoto, que en animales resulta de la fusión de un espermatozoide y un oocito. La “Biología del Desarrollo” estudia los procesos que se producen a partir de esta célula para generar un organismo adulto formado por diferentes tipos celulares organizados en tejidos. Los principales procesos celulares que se producen durante el desarrollo, y que están regulados genéticamente, son la proliferación, muerte y crecimiento celular, mediante los cuales se regula el número de células y sus tamaños, la diferenciación celular, a través de la cual las células adquieren sus características particulares, y la formación de patrones, que consiste en la organización espacial de los distintos tipos celulares. Estos procesos son comunes a todos los organismos pluricelulares existentes. La “Biología del Desarrollo” utiliza diferentes organismos modelo que reúnen ciertas características que permiten su estudio y manipulación experimental. Los organismos modelo más utilizados en esta disciplina son los vertebrados *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Danio rerio*, *Gallus gallus* y *Xenopus laevis*, los invertebrados *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* y la planta *Arabidopsis thaliana*.

2.- DROSOPHILA MELANOGASTER COMO ORGANISMO MODELO

Drosophila melanogaster es uno de los organismos modelo mejor conocidos a nivel genético, y ha sido empleado desde hace más de un siglo en estudios de genética y desarrollo (Castle, 1906). Su éxito como animal de experimentación radica en un tiempo de generación corto (10 días a 25°C), facilidad de cultivo en el laboratorio, genoma de pequeño tamaño y con poca redundancia genética y un alto grado de conservación en la secuencia de sus proteínas. *Drosophila melanogaster* es un insecto holometábolo cuyo ciclo vital comienza

con una fase embrionaria de veinticuatro horas de duración. Posteriormente transcurren tres etapas larvarias que preceden a un periodo pupal de cinco días. El proceso de desarrollo culmina con la eclosión del adulto o imago (Fig. I1). El genoma de *Drosophila* está formado por cuatro pares de cromosomas, un par de cromosomas sexuales (X e Y), dos pares autosomas grandes (II y III), y un par de cromosomas autosómicos pequeños (IV). El genoma de *Drosophila* ha sido secuenciado y anotado (Adams et al., 2000), lo que junto con las múltiples herramientas genéticas disponibles facilita el uso de este organismo como modelo de experimentación en estudios de genética del desarrollo.

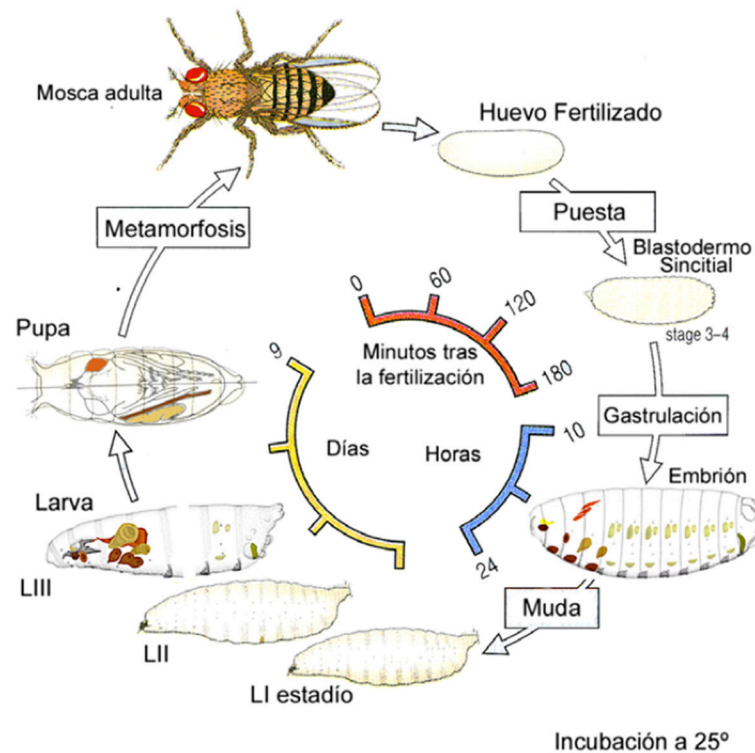


FIGURA I1

Ciclo vital de *Drosophila melanogaster* indicando la duración de cada estadio a una temperatura de cultivo de 25°. Modificado de "Principles of Development" de Lewis Wolpert.

3.- DESARROLLO DE LOS DISCOS IMAGINALES

A diferencia de lo que sucede en otros organismos, la mosca adulta no se forma como resultado del desarrollo continuo de las estructuras embrionarias. Así, la mayor parte de sus estructuras adultas derivan de los discos imaginales, que se originan por la proliferación de grupos de células localizadas en el ectodermo embrionario. De manera similar, el abdomen deriva de células denominadas histoblastos que proliferan durante el desarrollo pupal (Cohen et al., 1993; Garcia-Bellido and Merriam, 1971). Los primordios de los discos ima-

ginales, formados por entre 10 a 40 células, son especificados genéticamente en posiciones fijas del ectodermo del embrión (Bate and Arias, 1991; Cohen et al., 1993; Goto and Hayashi, 1997). Estas células precursoras se invaginan durante las últimas etapas del desarrollo embrionario formando sacos epiteliales aplanados compuestos por dos capas de células indiferenciadas. Más adelante, durante el desarrollo larvario, las células imaginales proliferan de manera exponencial, llegando su número a aumentar alrededor de 1000 veces. Durante este periodo de proliferación cada disco se subdivide en territorios con distintas especificaciones genéticas que corresponderán a las diferentes regiones y tipos celulares del adulto.

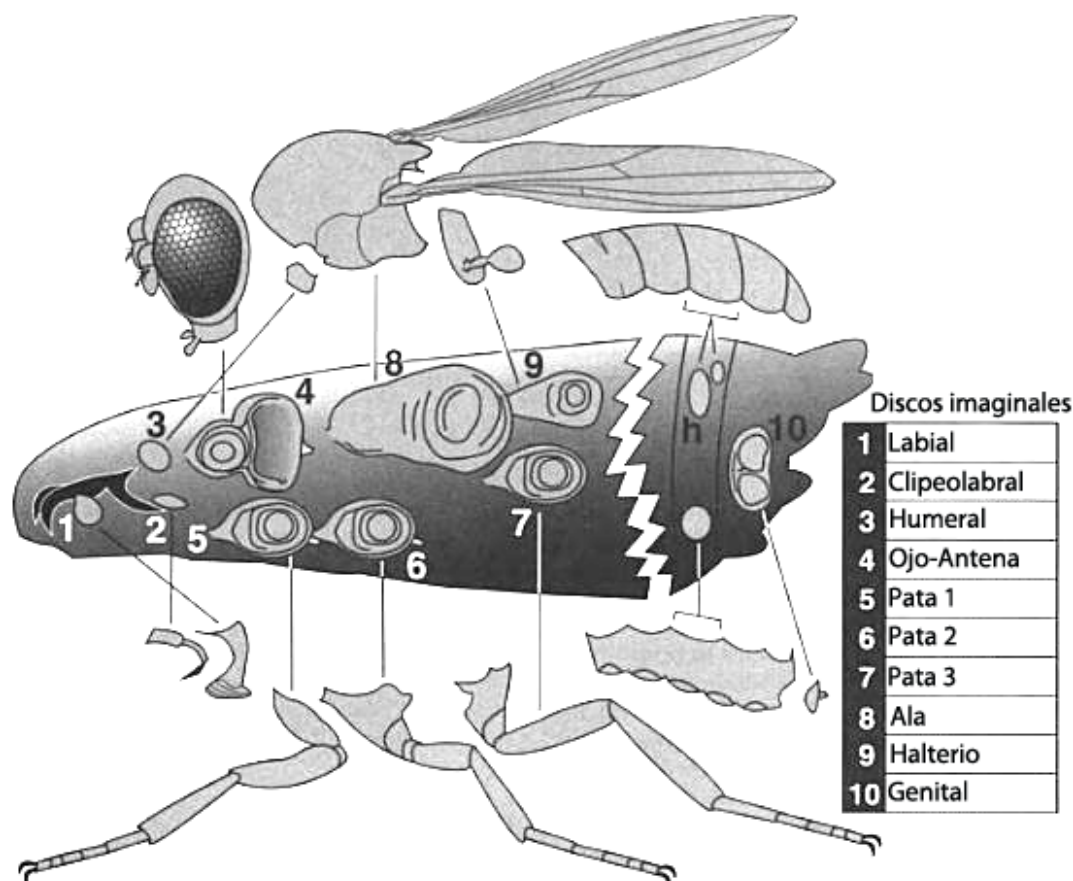


FIGURA I2: Discos imaginales de *Drosophila melanogaster*

Los discos imaginales se representan en el interior de la larva en la parte central, y sus nombres se indican por un código de números en la columna de la derecha. Los derivados de cada disco en la mosca adulta se muestran conectados a los discos por líneas en las partes superior (cabeza, notum, halterio y abdomen) e inferior (estructuras mandibulares, los tres pares de patas y la pleura abdominal). Modificado de "Imaginal Discs" de Lewis I. Held, Jr.

Existen 9 pares de discos imaginales y un disco imaginal genital (Fig. I2). Cada disco presenta dos capas epiteliales, una de ellas forma un epitelio pseudo-estratificado, donde se encuentran las células que darán lugar a todas las estructuras epidérmicas adultas, y la otra forma un epitelio escamoso denominado membrana peripodial. Esta última, se requiere para la eversión de los discos durante la metamorfosis (Fristrom et al., 1993; Pastor-Pareja et al., 2004) (Fig. I3). Durante la pupación se produce la histólisis de los tejidos larvarios y la evaginación de los discos imaginales

maduros (Pastor-Pareja et al., 2004). Por último, la formación del organismo adulto requiere la fusión ordenada de los discos imaginales y nidos de histoblastos (Fristrom, 1976; Martin-Blanco et al., 2000; Pastor-Pareja et al., 2004). Los discos imaginales son de gran utilidad para el estudio del desarrollo epitelial, ya que es muy sencillo aislarlos de la larva y visualizar directamente la expresión de genes implicados en la morfogénesis de las estructuras a las que darán lugar.

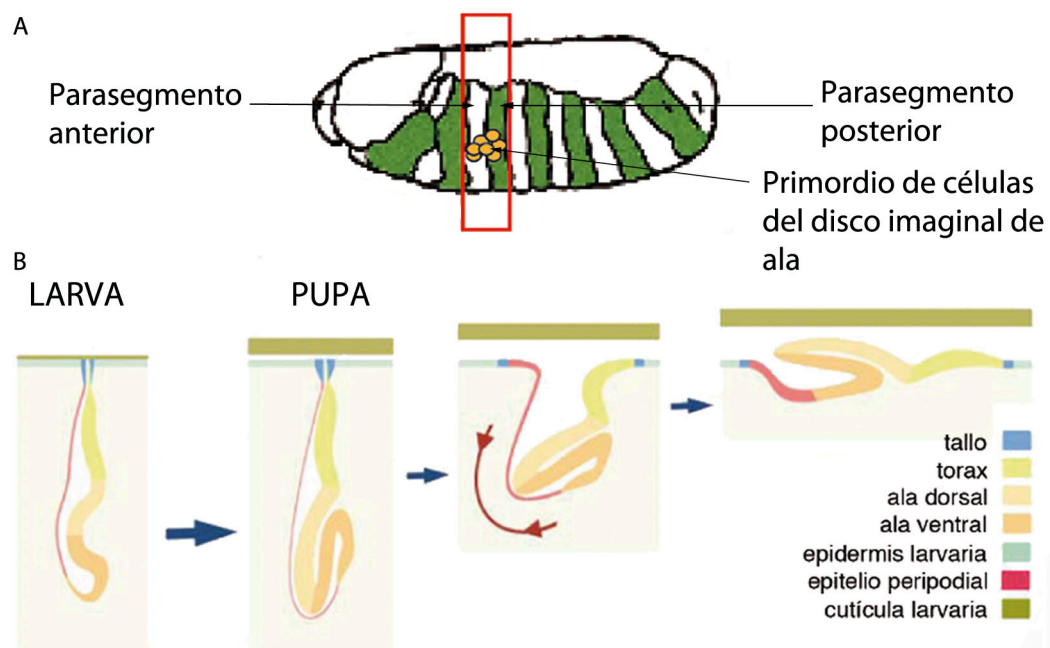


FIGURA I3

A) Representación esquemática de un embrión de *Drosophila* indicando la posición del primordio del disco imaginal de ala. Las franjas blancas y verdes representan los compartimentos anterior (blanco) y posterior (verde) de cada parasegmento. Modificado de Duffy et al. (2002). B) Representación esquemática de la eversión del disco imaginal de ala. Se aprecia su forma de saco aplanado y los movimientos que ocurren durante la eversión. Modificado de Pastor-Pareja et al. (2004)

Los discos imaginales se subdividen en territorios llamados compartimentos (García-Bellido et al., 1973). Cada compartimento deriva de un grupo de células cuya descendencia forma el compartimento entero (Crick y Lawrence, 1975). Cuando los discos se especifican en el ectodermo embrionario ya están divididos en compartimentos anterior (A) y posterior (P), debido a la identidad A y P de los parasegmentos embrionarios de los cuales provienen. En los casos de los discos genitales y de ojo-antena esta división ocurre durante el desarrollo larvario (Morata y Lawrence, 1978). Los siguientes compartimentos que se forman son el dorsal (D) y el ventral (V) en los discos de ala y halterio durante el segundo estadio larvario. Los compartimentos sirven para la correcta organización del crecimiento y formación de patrón de los discos, ya que sus bordes actúan como centros de señalización donde se expresan diferentes ligandos que actúan como “morfógenos”, tras ser secretados desde los bordes de compartimento y formar gradientes de concentración. Las células que detectan los ligandos perciben su concentración y la traducen en la activación de la expresión de genes diana. Así, las células cercanas a la fuente del ligando activan genes que necesitan una alta concentración de ligando, y en las que están más alejadas se activan otros genes regulados por niveles menores de señalización. Esto permite que las células estén especificadas

posicionalmente en función de su proximidad al borde, lo que es importante para el desarrollo del disco (Blair, 1995; Johnston et al., 1997; Lawrence and Struhl, 1996; Lecuit et al., 1996; Nellen et al., 1996; Struhl and Basler, 1993; Wolpert, 1996). Cinco rutas de señalización son las principales en intervenir en el desarrollo de todos los discos imaginales: Hedgehog (Hh), Decapentaplegic (Dpp), Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), Notch (N) y Wingless (Wg) (Blair, 1995; Johnston et al., 1997; Lawrence and Struhl, 1996). Estas rutas están conservadas en los distintos organismos superiores, donde también participan en la regulación de procesos de desarrollo y diferenciación celular.

4.- EL DISCO IMAGINAL DE ALA

Tanto el ala como el tórax de *Drosophila* se originan a partir del disco imaginal mesotorácico dorsal. Este disco, llamado disco imaginal de ala, se forma a partir de unas 20 células embrionarias que expresan el gen *vestigial* (*vg*) (Williams et al., 1991). Estas células proliferan durante el desarrollo larvario, formando el disco maduro que está compuesto por unas 50 000 células al final del tercer estadio larvario. Dentro del disco imaginal de ala se pueden distinguir dos regiones, una región que dará lugar al ala, que a su vez se divide en los territorios que darán lugar a la axila y al ala, y una región más dorsal que dará lugar al tórax (Fig. I4).

Como en la mayoría de los discos imaginales, el disco de ala está dividido en los compartimentos anterior (A) y posterior (P) debido a la expresión del factor de transcripción Engrailed (En) en el compartimiento P (Kornberg et al., 1985), y esta división se produce durante el desarrollo embrionario. Posteriormente, y ya durante el desarrollo larvario, el disco se divide perpendicularmente al eje A-P en una región Dorsal (D) y otra Ventral (V), debido a la expresión del gen *apterous* (*ap*) en las células dorsales (Díaz-Benjumea and Cohen, 1993) (Fig. I4). La generación de los bordes de compartimento A/P y D/V permiten el crecimiento y la formación del patrón debido a la activación de diferentes rutas de señalización. Así, la expresión del ligando Hedgehog (Hh) en el compartimento P induce la expresión en células anteriores del gen *decapentaplegic* (*dpp*) (Basler and Struhl, 1994; Zecca et al., 1995), y la activación de estas rutas de señalización en dominios centrados en el borde A/P es necesaria para dirigir el desarrollo del ala (de Celis et al., 1996; Mohler et al., 2000; Nellen et al., 1996; Vervoort et al., 1999). Por otro lado, en las células del borde D/V se activa la ruta Notch lo que permitirá, en primer lugar la expresión del gen *vg*, y luego del gen *wingless* (*wg*), formándose así el territorio de ala y el margen del ala, respectivamente (de Celis et al., 1996; Díaz-Benjumea and Cohen, 1995; Kim et al., 1995; Rulifson and Blair, 1995; Williams et al., 1994) (Fig. I4). El proceso de subdivisión en compartimentos y centros de señalización va seguido por la generación de dominios celulares más pequeños a partir de los cuales se especifican las estructuras del adulto, incluyendo las venas del ala y los órganos sensoriales del tórax. (de Celis, 2003). La formación de un disco maduro y finalmente de un ala adulta con un tamaño y patrón correcto requiere que los procesos de formación de patrón antes descritos estén acompañados de una regulación precisa del crecimiento y la proliferación celular.

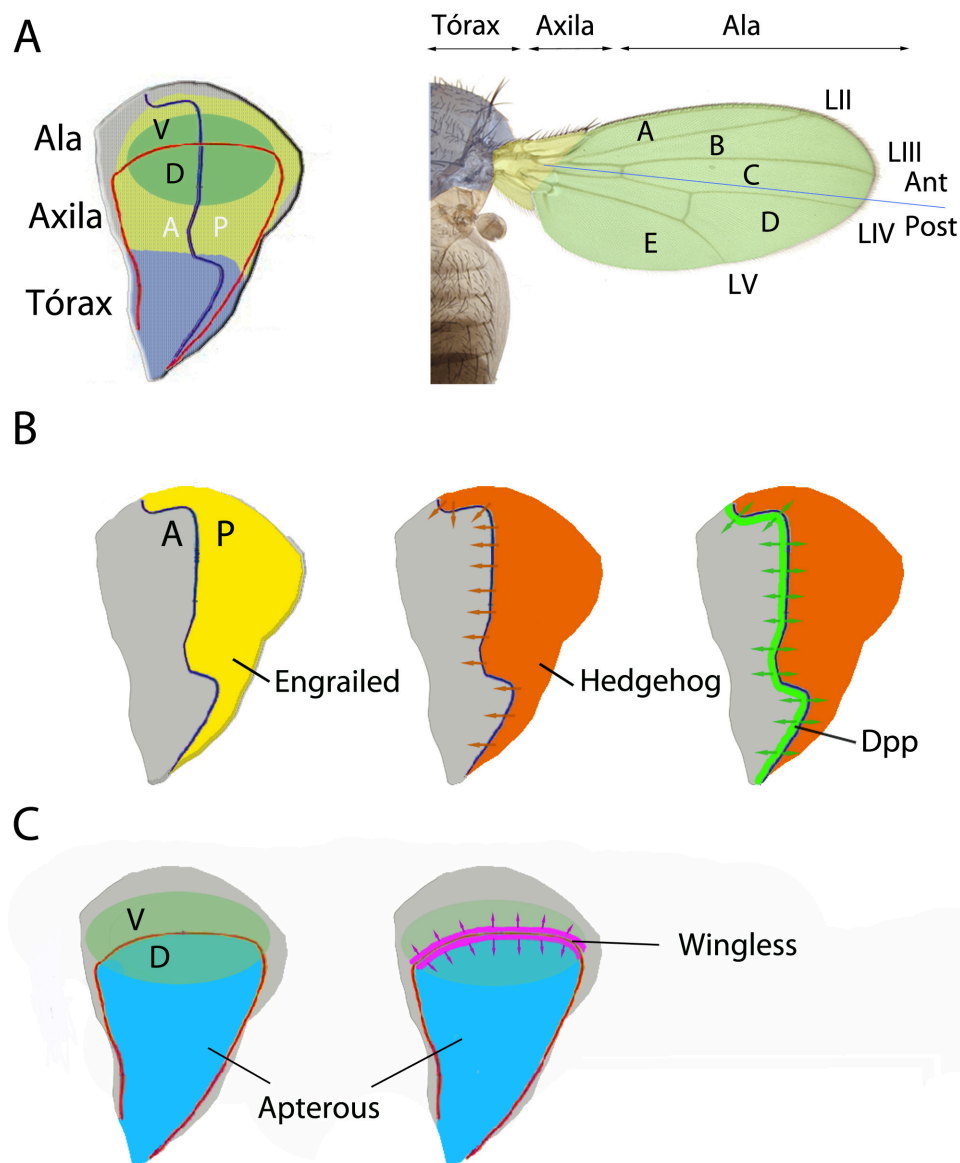


FIGURA I4

A) Esquema del disco imaginal de ala mostrando los bordes de compartimento antero-posterior (línea azul) y dorso-ventral (línea roja), e indicando en un código de colores las regiones precursoras del tórax (sombreado en azul), superficie del ala (sombreado en verde) y axila (sombreado en amarillo). Estas regiones están marcadas en los mismos colores en la fotografía de la derecha. **B)** Esquema de la señalización operativa en el borde A/P del disco imaginal de ala. El disco está dividido en los compartimentos Anterior (A) y Posterior (P) debido a la expresión del factor de transcripción Engrailed (amarillo) en el compartimento P. La expresión del ligando Hedgehog (naranja) en el compartimento P induce la expresión en células anteriores del gen *decapentaplegic* (Dpp; en verde), la activación de estas rutas de señalización en dominios centrados en el borde A/P es necesaria para dirigir el desarrollo del ala. **C)** Esquema de la señalización en el eje D/V del disco imaginal de ala. Durante el desarrollo larvario, se produce una subdivisión perpendicular al eje A-P en una región Dorsal (D) y otra Ventral (V), debido a la expresión del gen *apterous* (Azul) en las células dorsales. En las células del borde D/V se activa la ruta Notch, que a su vez activará la expresión del gen *wingless* (violeta), cuya función es necesaria para la formación del margen del ala.

5.-CONTROL DEL CRECIMIENTO

El tamaño de un organismo, así como el de los órganos que lo forman, están determinados por factores genéticos y ambientales. Cada especie animal, y *Drosophila melanogaster* no es una excepción, tiene un tamaño determinado, el cual suele variar muy poco entre individuos de la misma especie. El tamaño final depende del número de células y del tamaño de éstas, que su vez están regulados por el balance entre la proliferación celular, el crecimiento celular y la muerte celular. Por otro lado, el factor ambiental más determinante a la hora de establecer la tasa de crecimiento de un individuo y su tamaño final es la disponibilidad de nutrientes. Por ejemplo, moscas a las que se les ha reducido la disponibilidad de nutrientes durante su desarrollo larvario pueden llegar a tener la mitad del tamaño de moscas alimentadas sin restricciones (Fig. I5).



FIGURA I5

Reducción del tamaño de la mosca en condiciones de baja disponibilidad de alimentos. A la izquierda mosca alimentada en condiciones estándar, y a la derecha mosca criada en condiciones de falta de proteínas.

En todos los organismos eucariotas el punto principal en la detección de los niveles de nutrientes en la célula es la quinasa Target of Rapamycin (TOR). Esta quinasa integra una multitud de señales, regulando el crecimiento y la proliferación celular mediante el control de la síntesis de proteínas (Wullschleger et al., 2006). La función de TOR es también regulada mediante señales humorales a nivel del organismo, permitiendo coordinar el crecimiento individual de las células en los diferentes tejidos y órganos.

El crecimiento sistémico en *Drosophila* está controlado principalmente por las neuronas denominadas IPCs (Células Productoras de Insulina), el cuerpo graso y la glándula protorácica. La señalización por ILP (péptidos similares a la Insulina) regula el crecimiento y el metabolismo en respuesta a los niveles de nutrientes. *Drosophila* tiene 7 genes que codifican para estos ILPs,

cuyos homólogos en mamíferos son la Insulina y los IGFs (Insulin Growth Factors) (Brogiolo et al., 2001). Estas moléculas son producidas por un grupo de 14 células neurosecretoras llamadas IPCs (Insulin Producing Cells) situadas en una región del cerebro llamada *pars intercerebralis* análoga funcionalmente al hipotálamo en mamíferos (Ikeya et al., 2002; Rulifson et al., 2002). La diferenciación de las IPCs está mediada por el gen *eyeless* que es un homólogo del gen *Pax6*, cuya función es necesaria para la diferenciación de las células β -pancreáticas productoras de Insulina en mamíferos (Clements et al., 2008). La eliminación de las IPCs durante el desarrollo larvario produce una disminución del tamaño final de la mosca así como un retraso en el tiempo de desarrollo (Rulifson et al., 2002). Por contra, la expresión ectópica de alguno de los 7 ILPs produce sobre-crecimientos en la mosca (Brogiolo et al., 2001). Las ILPs secretadas por las IPCs se unen a receptores de Insulina presentes en tejidos periféricos como son los discos imaginales, promoviendo el crecimiento celular y la proliferación (Brogiolo et al., 2001)(Fig. I6).

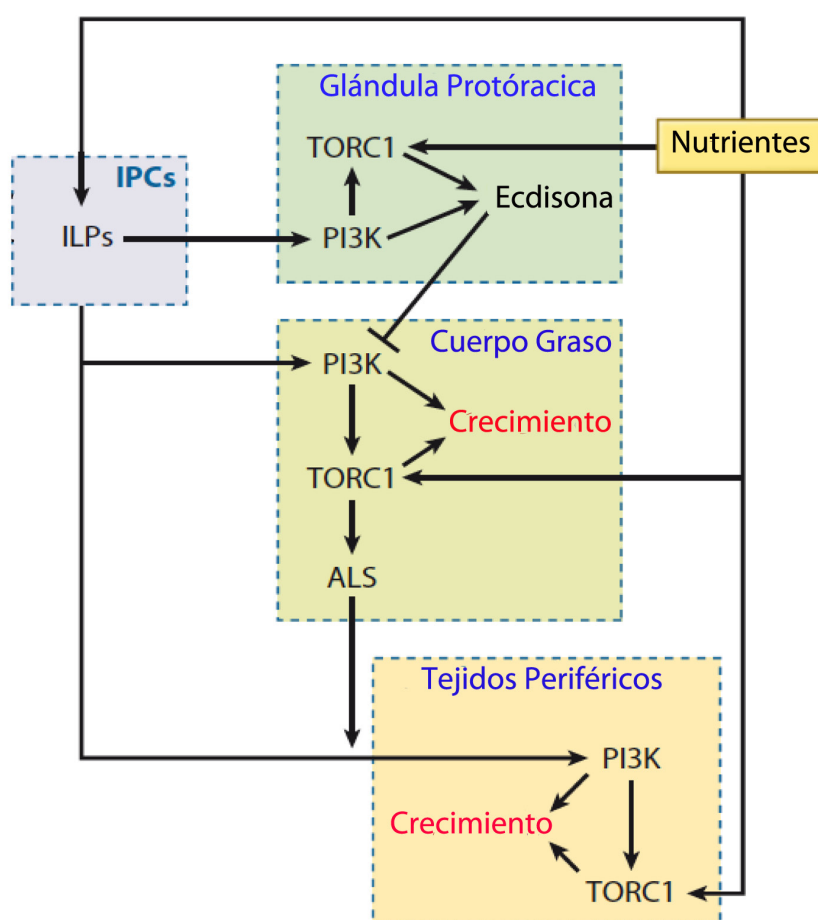


FIGURA I6: Órganos y mecanismos implicados en la regulación sistémica del crecimiento de *Drosophila*

Cada órgano o tejido monitoriza directamente los niveles de nutrientes (Nutrientes, caja amarilla) a través de la ruta de TOR (TORC1), e integran la información proveniente de los órganos reguladores del crecimiento a través del control de la actividad de la ruta InR (PI3K). El cuerpo graso controla los niveles de aminoácidos del organismo, las IPCs controlan los niveles de azúcares y junto con la glándula protóracica secretan señales hormonales que modulan las señales de crecimiento en el resto de los tejidos. (modificado de Hietakangas et al, 2009).

El segundo órgano fundamental implicado en el control del crecimiento sistémico en *Drosophila* es el cuerpo graso, un órgano análogo al hígado y al tejido adiposo de los mamíferos. Su función consiste en la detección de los niveles circulantes de aminoácidos en el organismo. Así, en la ausencia de los transportadores de aminoácidos presentes en el cuerpo graso (Slimfast, Minidisc o Pathetic) se produce una reducción del tamaño de todos los tejidos periféricos (Colombani et al., 2003; Goberdhan et al., 2005; Martin et al., 2000). Cuando se produce una bajada en los niveles de aminoácidos en el organismo, el cuerpo graso inicia un programa de autofagia que eleva los niveles de aminoácidos en el resto de la mosca (Rusten et al., 2004; Scott et al., 2007). En estas condiciones, se produce una reducción del tamaño de los tejidos periféricos debida a una reducción de la actividad de la ruta de la Insulina en dichos tejidos. De esta manera, el cuerpo graso dependiendo de los niveles de aminoácidos secreta una proteína llamada dALS (Acid-Labile subunit) (Colombani et al., 2003), la cual forma un complejo ternario con ILP-2 (secretado por las IPCs) y Imp-L2 (Imaginal Morphogenesis Protein-late 2), homólogo a IGFBP (Insulin Growth Factor Binding Protein) en mamíferos (Arquier et al., 2008). El funcionamiento de este complejo no está bien entendido todavía, pero se sabe que cambios en los niveles de sus componentes varían la actividad de la ruta de la Insulina en los discos imaginales (Honegger et al., 2008)(Fig. I6).

El crecimiento de los órganos en la mosca se produce exclusivamente durante el desarrollo larvario, ya que el imago sale del pupario con un tamaño final fijo. Los niveles nutricionales también marcan el tiempo de desarrollo, ya que en condiciones pobres de nutrientes el tiempo de desarrollo es mayor y se retrasa el momento de la pupación. La molécula que se encarga de controlar el tiempo de desarrollo y determinar el momento de la pupación es una hormona esteroidea secretada por la glándula protorácica llamada Ecdisona (Thummel, 2001). Los niveles de Ecdisona son controlados por la actividad de TOR en la glándula protorácica, que a su vez es dependiente de los niveles de nutrientes y de los niveles de ILPs (Layalle et al., 2008). El cuerpo graso también puede monitorizar los niveles de Ecdisona y así ajustar el ritmo de crecimiento. Los sistemas de intercambio de información entre estos tejidos coordinan el crecimiento celular con el tiempo de desarrollo (Fig. I6).

La coordinación del crecimiento entre órganos se implementa en cada célula a través de la ruta de la Insulina y TOR, mediante las cuales las células transducen las señales sistémicas enviadas por el cuerpo graso y las IPCs (Fig. I7). Las ILPs se unen al receptor de Insulina (InR), el cual recluta y activa a la proteína Chico, homóloga a IRS en mamíferos (Sustrato del Receptor de Insulina) y a dPI3K tipo I (Phosphatidil Inositol 3 kinase) (Engelman et al., 2006). Una vez activada dPI3K recluta en la membrana al PIP2 (Fosfatidil Inositol 4,5 difosfato), el cual se fosforila convirtiéndose en PIP3 (Fosfatidil Inositol trifosfato)(Fig. I8). Posteriormente, PIP3 recluta en la membrana a las proteínas PDK1 (3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1) y AKT (también conocida como Protein Kinase B -PKB-) (Alessi et al., 1997). AKT activado fosforila a su vez a varias proteínas, entre ellas dFOXO (Forkhead box class O) y dTSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2). Cuando está fosforilado el factor de transcripción dFoxo se localiza en el citoplasma (Brunet et al., 1999). Este factor de transcripción impide la proliferación y el crecimiento mediante la inhibición de la síntesis de dMyc y la activación de 4EBP (Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein), un inhibidor de la traducción (Gershman et al., 2007; Puig et al., 2003; Puig and Tjian, 2005; Teleman et al., 2005; Teleman et al., 2008). Además, en situaciones de baja actividad de la ruta Insulina, dFOXO está activo y promueve la síntesis de más receptores de Insulina con el fin de que la célula sea más sensible a los niveles bajos de ILPs (Puig and Tjian, 2005).

La quinasa AKT también fosforila a dTSC2 inhibiéndolo (Potter et al., 2002). dTSC2 forma parte de un complejo con dTSC1 cuya principal función es inhibir la actividad de la pequeña GTPasa Rheb (Ras Homolog Enriched in Brain), promoviendo la hidrólisis de GTP y la transición de Rheb-GTP (activo) a Rheb-GDP (inactivo) (Inoki et al., 2003; Zhang et al., 2003) (Fig. I8). En la forma unida a GTP Rheb fosforila y activa a la quinasa TOR (Bai et al., 2007; Long et al., 2007). La proteína TOR funciona en dos complejos diferentes TORC1 y TORC2 (Loewith et al., 2002). Ambos complejos son importantes para el crecimiento, pero sólo TORC1 es sensible a la inhibición por Rapamicina y es el responsable de la transducción de la señal en esta cascada de señalización (Fig. I7). TORC1 induce crecimiento celular promoviendo la síntesis de proteínas mediante la fosforilación de la quinasa Ribosomal S6 (dS6K), la cual activa la traducción dependiente de CAP de los ARNm mensajeros (ARNm), y también inhibiendo mediante fosforilación d4E-BP, lo que facilita la formación del complejo de iniciación de la traducción (Pause et al., 1994). Finalmente el complejo TORC1 promueve la síntesis de dMyc, estimulando la proliferación celular (Teleman et al., 2008), y activa a los factores de transcripción UBF, SL1 y TIF-1A para que activen la síntesis de diferentes componentes ribosomales (Grewal et al., 2007; Hannan et al., 2003; Mayer et al., 2004).

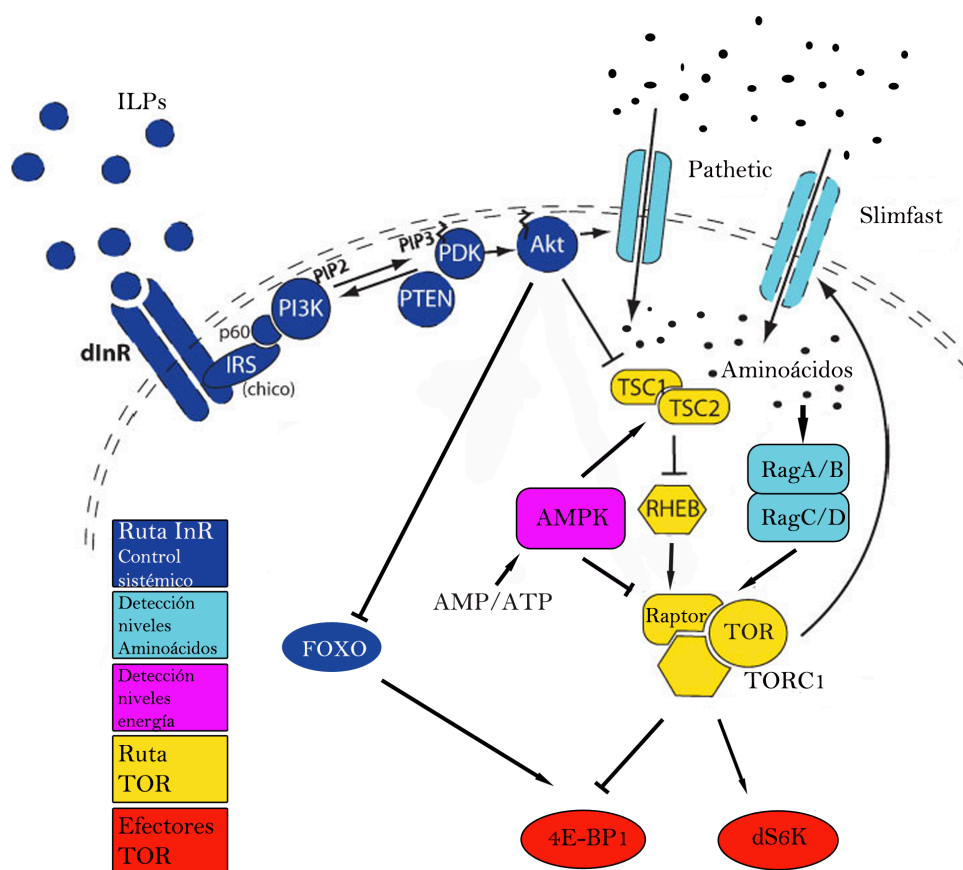


FIGURA R7: Representación esquemática de las rutas de señalización Inr y TOR en *Drosophila*

Los elementos de la ruta Inr se representan como figuras azules con su nombre correspondiente. Los elementos de la ruta TOR se representan en el código de colores indicado para los detectores de aminoácidos (celeste), de los niveles de energía (violeta), elementos de transducción de la ruta TOR (amarillo) y sus efectores (rojo). Las flechas significan activación y las barras represión.. Modificado de Kerry Mirth et al., 2007.

La señal sistémica, que es interpretada por cada célula del tejido periférico, se integra a la capacidad que tienen las células para detectar los niveles energéticos y nutricionales mediante la detección de los niveles de aminoácidos. Para poder detectar estos niveles la célula transporta aminoácidos esenciales como la Glutamina y la Leucina a su interior mediante diferentes transportadores como son Slimfast, MiniDisc o Pathetic (Colombani et al., 2003; Goberdhan et al., 2005; Martin et al., 2000). El mecanismo por el cual la célula detecta los niveles de aminoácidos no se conoce en detalle, pero se sabe que en él participa un grupo de GTPasas pequeñas llamadas Rag que transducen esta señal hasta el complejo TORC1 (Kim et al., 2008; Sancak et al., 2008). La familia de proteínas Rag en *Drosophila* consta de cuatro miembros que forman un complejo heterodimérico consistente en una proteína Rag A o B con una proteína Rag C o D. El mecanismo por el cual estas proteínas fosforilan a TOR también es poco conocido, aunque se sabe que la disponibilidad de aminoácidos regula la unión GDP/GTP de las proteínas Rag (Kim et al., 2008). Cuando hay suficientes aminoácidos en el medio las proteínas Rag se activan formando un complejo compuesto por una proteína Rag A-GTP unida a una RagC-GDP. Este complejo se une a TOR y lo lleva a unas vacuolas perinucleares donde será fosforilado por Rheb (Sancak et al., 2008).

La célula depende también de la disponibilidad de energía en forma de ATP para crecer. Los niveles de ATP son medidos de manera indirecta mediante la cantidad de AMPK (AMP-activated protein kinase), que dependen de la razón entre los niveles de AMP y los de ATP (Hardie, 2008). Los niveles de AMPK suben cuando hay poco ATP en la célula, lo que lleva a la inhibición de TORC1. Esto se produce mediante la fosforilación de Raptor, un componente del complejo TORC1, degradándolo tras su ubiquitinación, y también mediante la activación de dTSC2 (Gwinn et al., 2008; Inoki et al., 2003). Como podemos ver, existe una amplia intercomunicación entre el sistema celular y el sistémico, siendo la proteína TOR un elemento principal de regulación. La existencia de múltiples tipos de efectores que actúan sobre TOR permite una gran flexibilidad a la hora de regular el crecimiento celular en respuesta a las condiciones ambientales.

6.-CONTROL DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR

Durante el desarrollo algunas células pueden adquirir identidades inadecuadas, sufrir daños por diferentes tipos de estrés, tener una tasa de crecimiento demasiado lenta, o simplemente no ser requeridas en los siguientes estadios del desarrollo. Estas células dañadas o no deseadas son eliminadas de los tejidos mediante un programa de muerte celular conservado a lo largo de la evolución. Este sistema está ejecutado por unas proteínas denominadas Caspasas, que son expresadas en forma inactiva y requieren de proteólisis para activarse. En *Drosophila* se han descrito 3 Caspasas iniciadoras: Dronc, Dredd y Strica (Dorstyn et al., 1999; Doumanis et al., 2001), cuya función radica en formar junto con proteínas adaptadoras el “apoptosoma” (Adams and Cory, 2002; Colin et al., 2009) que activa a las Caspasas efectoras, responsables últimas de la muerte celular. Existen 4 Caspasas efectoras: Decay, Damm, Drice y Dcp-1 (Dorstyn et al., 1999; Fraser et al., 1997; Harvey et al., 2001; Song et al., 1997). Solamente Drice y Dcp1 están bien caracterizadas y son activadas por Dronc (Yan et al., 2006), mientras que Strica aunque produce apoptosis no está bien caracterizada (Baum et al., 2007; Doumanis et al., 2001; Leulier et al., 2006) y Dredd está asociada con procesos no apoptóticos (Stoven et al., 2003). Drice y Dcp1 al ser activadas producen una serie de sucesos celulares muy bien caracterizados hasta producir la muerte de la célula: reducción del volumen

celular, pérdida de la adhesión con las células vecinas y la matriz extracelular, fragmentación del ADN, condensación de la cromatina y finalmente la formación de “cuerpos apoptóticos” que serán fagocitados por otras células (Kerr and Searle, 1972).

La activación de las Caspasas en *Drosophila* está controlada principalmente por dIAP1 (Proteína Inhibidora de la Apoptosis 1) que inhibe la actividad de las Caspasas Dronc y Drice (Goyal et al., 2000; Hawkins et al., 1999; Lisi et al., 2000). Los niveles de dIAP1 son a su vez controlados por los genes pro-apoptóticos *reaper* (*rpr*), *head involution defective* (*hid*) y *grim*, unas ubiquitin ligasas que dirigen la degradación de dIAP1 (Chen et al., 1996; Grether et al., 1995; White et al., 1994). La apoptosis es requerida en algunos órganos de *Drosophila* para su correcto desarrollo. Por ejemplo, es necesaria para el desarrollo de la cuerda nerviosa ventral en el sistema nervioso central (Sonnenfeld and Jacobs, 1995), en el desarrollo del disco imaginal de pata es necesaria para la correcta unión entre los tarsos (Manjon et al., 2007), y durante la pupación también es necesaria para la eliminación de las células intermatidiales en el ojo (revisado en Rusconi et al., 2000). Si bien los sucesos apoptóticos que acabamos de describir están programados durante el desarrollo, existen otros sucesos no programados que también terminan en apoptosis. En el disco imaginal de ala no existe apoptosis durante la mayor parte de su desarrollo (Milan et al., 1996), pero ésta puede activarse por la producción de una discontinuidad en los gradientes de señalización de las proteínas Hh, Dpp o Wg (Adachi-Yamada and O'Connor, 2002; Shen and Dahmann, 2005), cuando se confrontan células que crecen lentamente con células con una tasa de crecimiento superior en un proceso denominado “competición celular” (Morata and Ripoll, 1975; Moreno et al., 2002a), cuando las células pierden la polaridad apico-basal siendo propensas al desarrollo de tumores (Brumby and Richardson, 2003; Igaki et al., 2006; Uhlirova et al., 2005) y cuando el disco imaginal es expuesto a situaciones de estrés celular como el choque térmico (Arya and Lakhotia, 2008; Arya et al., 2007), daño físico (Bosch et al., 2005) o por radiaciones ionizantes que dañan el ADN (Brodsky et al., 2004; Perez-Garijo et al., 2004). Estas eventualidades que terminan produciendo la muerte celular dependen de la actividad de la ruta de señalización JNK (Jun-N-Terminal Kinase). La ruta JNK está muy conservada a lo largo de la evolución y, además de la inducción de la apoptosis, es responsable de muchos procesos biológicos en la mosca como son el cierre dorsal (Jacinto et al., 2002), el cierre del tórax (Zeitlinger and Bohmann, 1999), la eversión de los discos imaginales (Pastor-Pareja et al., 2004), cicatrización (Galko and Krasnow, 2004; Martin and Parkhurst, 2004), la respuesta inmune (Boutros et al., 2002; Delaney et al., 2006), daño a tejidos (Pastor-Pareja et al., 2008), y la polaridad planar (Boutros et al., 1998; Weber et al., 2000), entre otros. La vía de señalización JNK puede ser activada extracelularmente por varios sistemas ligando/receptor como son Eiger/Wengen (Igaki et al., 2002; Kauppila et al., 2003; Moreno et al., 2002b), PVF/PVR (Ishimaru et al., 2004) y Wiggless/Frizzled (Boutros et al., 1998)(Fig. I9), así como intracelularmente mediante un mecanismo no caracterizado por el cual dp53 activa a JNK cuando se induce daño en el ADN mediante radiaciones ionizantes (McEwen and Peifer, 2005; Moskalev et al.). Dependiendo del estímulo recibido se activan por fosforilación las quinasas dTraf1, dTraf2, dRac1, Msn y Dsh (Cha et al., 2003; Chen et al., 2002; Kuranaga et al., 2002; Liu et al., 1999; Su et al., 1998; Teramoto et al., 1996a; Xue et al., 2007), aunque la jerarquía en la activación de estas proteínas no está del todo bien caracterizada ya que se sabe que dTraf1 puede activar a Msn (Cha et al., 2003). Estas a su vez fosforilan a las JNKKKs dTak1, dASK1, Slipper y Mekk1 (Inoue et al., 2001; Sathyanarayana et al., 2003; Silverman et al., 2003; Stronach and Perrimon, 2002; Takatsu et al., 2000; Wang et al., 2001)(Fig. I8). Las JNKKKs transducen la señal de fosforilación a la proteína JNKK denominada Hemipterous (Hep)

en *Drosophila* (Glise et al., 1995), que a su vez fosforila a la proteína JNK Basket (Bsk) (Riesgo-Escovar et al., 1996). Finalmente, Bsk fosforila a los factores de transcripción Jun y Fos, y éstos a su vez promueven la transcripción de diferentes genes implicados en las diferentes funciones que tiene la ruta, así como la transcripción de la fosfatasa Puckered (Puc). La función de esta última es regular negativamente la señalización JNK mediante la desfosforilación de Bsk, constituyendo un bucle de retroalimentación (Martin-Blanco et al., 1998)(Fig. I8).

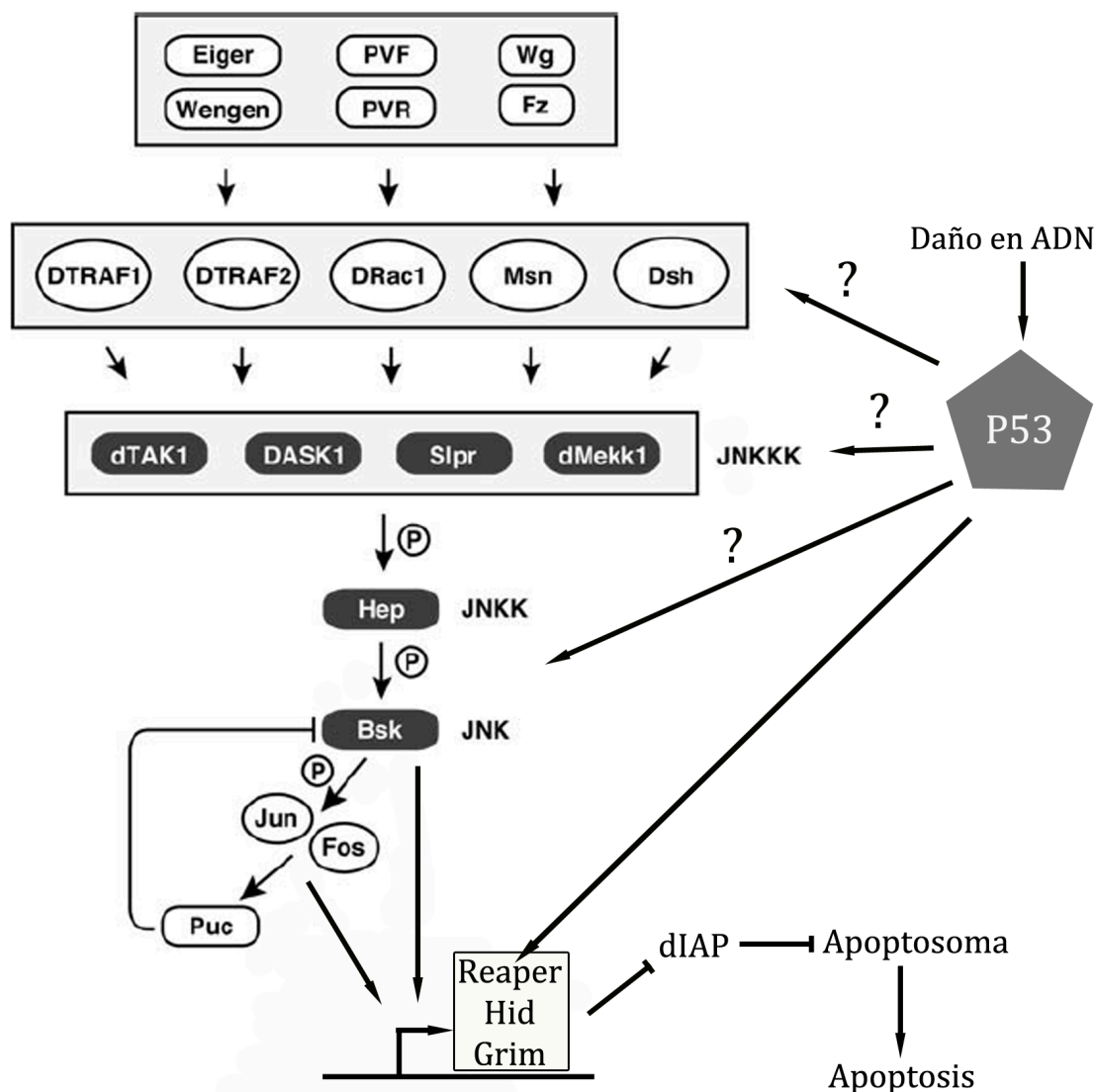


FIGURA I8: Representación esquemática de la ruta de señalización JNK en *Drosophila*

La ruta JNK puede ser activada de manera extracelular por complejos ligando/receptor (Eiger/Wengen, PVF/PVR, Wg/Frizzled, representados en la parte superior de la figura) o de manera intracelular a través de P53 (a la derecha). La señal se transmite a través de una serie de proteínas (dTraf1/2, Dsh, Rac, Msn), donde Msn también puede activarse a través de dTraf1, al módulo central compuesto por JNKKK (dTAK1, dASK1, Slpr y Mekk1), JNKK (Hep) y JNK (Bsk). La activación de esta cascada de señalización culmina en la fosforilación de los factores de transcripción Jun y Fos. Estos factores de transcripción entre otras funciones activan a los genes pro-apoptóticos (Reaper, Hid y Grim, abajo en el esquema) y a la fosfatasa Puc. A su vez los genes pro-apoptóticos inhiben a dIAP, iniciándose la apoptosis. Modificado de Igaki, 2009.

7.-EL DISCO IMAGINAL COMO SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN GÉNICA

El conocimiento exhaustivo del desarrollo del disco imaginal, así como las múltiples técnicas y manipulaciones experimentales que se pueden utilizar en este sistema, permiten realizar búsquedas y análisis de nuevos genes implicados en su desarrollo. Por ejemplo, en mutagénesis de falta de función se identificaron los genes *chico*, homólogo del gen IRS en mamíferos y cuya falta de función produce una reducción del tamaño de la mosca superior al 50% con respecto a una mosca normal debido a una reducción del número y tamaño de las células (Bohni et al., 1999), y el gen *Pten*, regulador negativo de la vía InR cuya falta de función produce fenotipos de sobre-crecimientos (Gao et al., 2000; Gorderdhan et al., 1999). También se identificó en este tipo de mutagénesis el gen *dTak-BP2*, que codifica para una proteína que se une a dTAK y permite la transducción de la señal en la vía de señalización JNK (Geuking et al., 2005). Un problema de las mutagénesis de falta de función radica en que muy frecuentemente las mutaciones resultan ser letales, lo que impide la visualización del fenotipo. Además, la posible existencia de una redundancia funcional hacen que muchos genes no puedan ser identificados debido a que sus mutaciones no están asociadas a fenotipos. Otra técnica complementaria que se ha empleado para la búsqueda de nuevos miembros implicados en procesos del desarrollo ha sido la mutagénesis de ganancia de función, en la que se aumenta la expresión génica mediante la técnica Gal4/UAS (Brand and Perrimon, 1993; Duffy, 2002). Gracias a esta técnica se han identificados genes como *eiger*, que codifica un ligando de la ruta JNK (Igaki et al., 2002), o *Dp110/dPI3K*, cuya sobre-expresión producía sobre-crecimientos (Leevers et al., 1996).

Gracias a los fenotipos estudiados tanto en condiciones de exceso como de falta de función sabemos que cuando se reduce la actividad de un gen de la ruta InR/TOR se produce una reducción del tamaño del ala debido a una reducción del número y tamaño de las células sin afectar al patrón de diferenciación. En cambio, y de manera complementaria, cuando activamos las rutas InR/TOR en el ala producimos el efecto contrario. Cuando reducimos la actividad de la ruta JNK en el ala durante el desarrollo larvario no encontramos ningún fenotipo debido a que no se requiere la actividad de la ruta en dicho estadio en condiciones normales del desarrollo. Sin embargo, la activación ectópica de esta ruta de señalización en el ala produce fenotipos de reducción de su tamaño debido a la formación de un número menor de células, llegando en algunos casos extremos a afectar al patrón de diferenciación por la pérdida masiva de células.

8.- IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN GEN IMPLICADO EN EL CRECIMIENTO DEL ALA

Con el objetivo de encontrar nuevos genes implicados en la señalización de las rutas JNK y TOR, escrutamos los fenotipos de sobre-expresión identificados en dos mutagénesis de ganancia de función que se realizaron en el laboratorio (Cruz et al., 2009; Molnar et al., 2006). De todos ellos, seleccionamos una inserción de un elemento P-UAS en la región 5' UTR del gen *CG7097*, debido a que su fenotipo de sobre-expresión era compatible con los fenotipos conocidos cuando se afectan las rutas de señalización InR, TOR y JNK. El gen *CG7097* ha sido recientemente denominado *happyhour* (*hppy*), debido a la resistencia a la sedación por etanol que presentan sus mutantes hipomorfos (Corl et al., 2009). La proteína CG7097 es homóloga a la MAP4K3 (Dan et al., 2001),

y presenta dos isoformas de 1218 aminoácidos (isoforma A) y de 947 aminoácidos (isoforma B). Ambas isoformas contienen un dominio Ser/Thr quinasa en la región N-Terminal y un dominio CNH (Citron Homology Domain) en la región C-Terminal. Estas proteínas pertenecen al grupo de proteínas Sterile 20 quinasas de levaduras, que tiene diferentes homólogos en humanos, *D. melanogaster*, *C. elegans* y otros organismos. El grupo Ste20 quinasas se divide en 2 familias: p21-Activated Kinases (PAK) y Germinal Center Kinases (GCK). CG7097 tiene homología con la subfamilia GCK-I (Germinal Center Kinase-I, también conocida como MAP4K3)(Dan et al., 2001). La subfamilia GCK-I, además de los ya citados dominios, tiene una región intermedia muy variable, con motivos ricos en prolinas. Se ha propuesto en trabajos anteriores que esta proteína está implicada en la regulación de la ruta Imd en respuesta a infecciones por *E.coli* en células de *Drosophila* (Kallio et al., 2005), en la inhibición de la señalización de la ruta EGFR en neuronas del sistema nervioso central de *Drosophila* (Corl et al., 2009), y más recientemente en la regulación de la actividad del complejo TORC1 en células de *Drosophila* (Findlay et al., 2007).

En la presente tesis hemos usado las ventajas que nos brinda el modelo del ala de *Drosophila* para analizar los requerimientos funcionales de MAP4K3 en el desarrollo de un epitelio. Nuestros resultados indican que la falta de función de MAP4K3 causa débiles defectos en la activación de las rutas JNK y TOR, y que estos requerimientos se manifiestan de manera muy significativa cuando enfrentamos a las células a diferentes condiciones de estrés. De esta forma, aunque MAP4K3 no tiene una función vital durante el desarrollo normal del ala, si es necesaria para conseguir niveles máximos de actividad de las rutas TOR y JNK en situaciones de estrés. También encontramos que el exceso de función de MAP4K3 resulta en un fenotipo de reducción de tamaño del ala debido a la disminución del número y tamaño de células que la componen. Estos efectos están provocados por un efecto dominante negativo en la vía TOR a nivel de las proteínas Rags y por la activación de la ruta JNK. MAP4K3 se expresa en el citoplasma de todas las células del disco imaginal de ala, así como de otros tejidos, y en ensayos de pull-down encontramos que esta proteína puede interactuar con las Rag GTPasas y con TOR, lo que sugiere que es un componente del complejo TORC1.



II. OBJETIVOS

- 1.- Identificar el gen responsable del fenotipo de sobre-expresión observado en combinaciones entre la inserción P-GS *EP-704* y líneas Gal4 de expresión en ala.
- 2.- Identificar los requerimientos funcionales del gen *CG7097* durante el desarrollo del ala.
- 3.- Analizar la relación funcional y bioquímica entre la proteína MAP4K3 y la actividad de la ruta TOR.
- 4.- Identificar en que paso de la ruta de señalización JNK participa la proteína MAP4K3.
- 5.- Definir la función del gen *CG7097* durante situaciones de estrés celular.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1.-CULTIVO DE *DROSOPHILA*

El mantenimiento de todas las estirpes y la ejecución de los experimentos se llevaron a cabo en cámaras de temperatura reguladas a 17°C, 25°C y 29°C. La composición del medio de cultivo convencional (medio normal) y rico en proteínas fue la siguiente:

Componentes	Medio Normal	Medio Rico en Proteínas
Agua	500ml	500ml
Agar	7,5g	7,5g
Sacarosa	50g	12,5g
Levadura	50g	200g
Acido Propiónico (95%)	1,5ml	1,5ml

Para la preparación del medio rico en proteínas se mezcló el agua, el agar, la sacarosa y la levadura (según cantidades indicadas en la tabla) en un Erlenmeyer. Tras hervir la solución durante 30 minutos esta se atempera a 60°C antes de añadir el ácido propiónico. Se dispensaron entre 8 y 10 ml por vial. En los ensayos donde se suprimieron las proteínas del medio, las larvas de tercer estadio larvario temprano crecidas en un medio normal se lavaron con PBS y se situaron en viales que contenían papel de filtro saturado con agua y azúcar.

2.-ESTIRPES DE *DROSOPHILA*

Toda la información relativa a las estirpes de moscas utilizadas se encuentra en la dirección web: www.flybase.bio.indiana.edu. Se utilizó la línea generada en el laboratorio *UAS-EP704* (Molnar et al., 2006). Las condiciones de sobre-expresión se generaron empleando las siguientes líneas Gal4 y UAS: *act-Gal4*, *638-Gal4*, *179-Gal4*, *ap-Gal4* (Calleja et al., 1996), *dpp-Gal4*, *omb-Gal4*, *hb-Gal4*, *en-gal4*, *gmr-Gal4*, *ey-Gal4* (Hauck et al., 1999), *dll-Gal4* (Calleja et al., 1996), *sal^{EP}-Gal4* (Cruz et al., 2009), *nub-Gal4* (Calleja et al., 1996), *ppl-Gal4* (Zinke et al., 1999), *UAS-dLAP*, *UAS-puc^{2A}* (Martin-Blanco et al., 1998), *UAS-hep^{CA}* (Weber et al., 2000), *UAS-Eiger* (Igaki et al., 2002), *UAS-TOR^{WT}*, *UAS-TOR^{TE}*, *UAS-Dp110^{D954A}*, *UAS-RagA^{Q61L}* (Kim et al., 2008), *UAS-RagA^{T16N}* (Kim et al., 2008), *UAS-RagA^{WT}* (Kim et al., 2008), *UAS-RagC** (Kim et al., 2008), *UAS-RagC^{DN}* (Kim et al., 2008), *UAS-dS6K^{TE}*, *UAS-dS6K^{DN}*, *UAS-slf^{WT}* (Colombani et al., 2003), *UAS-Akt^{excl}*, *UAS-Bsk^{DN}*, *UAS-Bsk^{AY}*, *UAS-P35* (Zhou et al., 1997), *UAS-GFP* (Ito et al., 1997).

Las líneas UAS utilizadas para expresar ARNs de interferencia se obtuvieron de las colecciones de Japón (www.shigen.nig.ac.jp/fly/nigfly/) y de Viena (www.vdrc.at), y fueron: *UAS-Dp110-i* (ID 38985 VDRC), *UAS-TOR-i* (ID 5092-R2 DGRC), *UAS-raptor-i* (ID 4320-R2 DGRC), *UAS-S6K-i* (ID 10539-R3 DGRC), *UAS-Akt-i* (ID 2902 VDRC), *UAS-Pten-i* (ID 35731 VDRC), *UAS-TSC1-i* (ID 22252 VDRC), *UAS-TSC2-i* (ID 6313 VDRC), *UAS-MAP4K3-i* (ID 35166 VDRC), *UAS-hep-i* (ID 47507 VDRC), *UAS-msn-i* (ID 16973-R2 DGRC), *UAS-path-i* (ID 44537 VDRC), *UAS-dTraf1-i* (ID 16125 VDRC), *UAS-slf-i* (ID 45587 VDRC), *UAS-4EBP1-i* (ID 35439 VDRC), *UAS-CG1139-i* (ID 8907 VDRC), *UAS-Pdk1-i* (ID 18736 VDRC), *UAS-ricor-i* (ID 8002-R1 DGRC), *UAS-Mekk1-i* (ID 25528 VDRC), *UAS-Mkk4-i* (ID 26928 VDRC), *UAS-Wengen-i* (Kanda et al., 2002). Se empleó las deficiencias *Df(2R)Exel6069* como una delección del gen MAP4K3 y la deficiencia *Df(3R)H99* para el análisis de procesos apoptóticos. También se utilizó la línea *w; Viking-GFP/CyO* para visualizar la expresión de la lamina basal y *w; puc-LacZ/TM6b* como reportera de la actividad de la ruta de señalización JNK.

3.-TÉCNICAS GENÉTICAS E HISTOLOGICAS

3.1.-Generación de alelos de falta de función

Se utilizó ENU (Etil Nitroso Urea) como agente mutagénico para causar cambios de base (Ashburner, 1989). Los machos isogénicos y homocigóticos para la línea *EP-704* de aproximadamente tres días de edad se mantuvieron durante 4-5 horas en ayunas y luego se alimentaron durante 24 horas con una solución de agua azucarada con ENU a una concentración de 0,4 mM, que causa al menos una mutación por brazo cromosómico (Ashburner, 1989). Posteriormente se cruzaron en masa con hembras de genotipo *act-Gal4/CyO*. Se seleccionaron aquellos individuos viables de genotipo *EP-704/act-Gal4*. Esta combinación es letal debido a la sobre-expresión del gen *Map4k3*, y por tanto los individuos viables deberían ser mutantes para este gen. Se trataron un total de 13500 cromosomas, y se aislaron como stocks independientes tres revertientes, denominados *EP-704^{IV2}*, *EP-704^{4T1}* y *EP-704^{2G1}*.

3.2.-Hibridación “*in situ*”

Las hibridaciones *in situ* realizadas en los discos imaginales se llevaron a cabo con una sonda de ARN del gen *Map4k3* marcadas con Digoxigenina (Roche™). El ADNc a partir del cual se realizó la sonda (RH10407) se obtuvo de la colección de Berkeley Drosophila Genome Project. Las bacterias transformadas se crecieron en placas de LB-agar con cloranfenicol (68µg/ml) a 37° C durante 14-16 horas. Colonias individuales se crecieron en 5ml de cultivo líquido de LB con cloranfenicol (68µg/ml) durante 14-16 horas a 37° C en agitación y ADN plasmídico se purificó con el Sistema de Purificación de ADN de Promega. Para la generación de las sondas, 2 µg de ADNc se linealizó mediante digestión con la enzima de restricción XhoI. Para el marcaje de la sonda se llevó a cabo una reacción de transcripción a partir del ADNc linealizado (0,3-1 µg) con las ARN polimerasa SP6 (para la sonda antisentido) y T7 (para la sonda sentido). Tras 2 horas de transcripción a 37°C, las sondas se incubaron con ADNasaI durante 15 minutos a 37 °C y se precipitaron con EDTA 0.5M, LiCl 5M y Etanol Absoluto. Para la hibridación *in situ*, se disectaron larvas de tercer estadio en PBS y se fijaron durante 30 minutos en Paraformaldehído 4%. Tras 3 lavados de 5 minutos con PBT-0,1% Tween20, se fijaron de nuevo durante 20 minutos con Paraformaldehído 4% + 0,1% Tween20, se realizaron varios lavados con PBT-0,1% Tween20 y se guardaron a -20 °C en Solución de Hibridación (50% Formamida, SSC 5X, 100 µl/mg ADN de esperma de salmón, 50 µg/mg heparina y 0,1% Tween20). Tras 4 horas de prehibridación a 55 °C en Solución de Hibridación se llevó a cabo la hibridación a 55 °C con 2 µl de sonda (desnaturalizada a 80 °C durante 10 minutos) en 100 µl de Solución de Hibridación durante toda la noche. Los lavados de la sonda se realizaron a 55 °C con Solución de Hibridación y con Solución HYBE (50% Formamida + 50% SSC 5X) + PBT-0,1% Tween20. Para la detección de la sonda se realizó una incubación durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-Digoxigenina (Roche™) en una dilución 1:4000. Para el revelado se empleó Solución de Color (100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 100mM Tris-HCl pH 9,5 y 0,1% Tween20) a la que se añadió NBT y BCIP (Roche™). El tiempo de revelado fue entre 5 minutos y 1 hora, tras lo cual se realizaron varios lavados con PBT-0,1% Tween20. Los discos imaginales se montaron en Glicerol 70%. Las imágenes se captaron con una cámara digital Spot acoplada a un microscopio Zeiss Axioplan y se procesaron utilizando el software PhotoShop (Adobe Inc)

3.3.-Inmunohistoquímica

Se utilizaron los anticuerpos primarios de conejo anti-Caspasa3 activada (1:50, Cell Signalling Technology™), anti-Fosfohistona III (PH3) (1:500, Upstate Biotechnology™), y anti β-gal (1:200) (Promega™). Se emplearon los anticuerpos monoclonales procedentes del Hybridoma Bank (Iowa University) anti-Arm (1:50), anti-FasIII (1:100), anti-Dlg (1:200) y anti-Wg (1:50). El marcaje de núcleos se realizó utilizando el agente intercalante de DNA Topro-3 (1:1000, Molecular Probes™). Los anticuerpos secundarios utilizados proceden de Jackson Immunological Laboratories™, y se utilizaron a una dilución de 1:200.

Se diseccionaron larvas de tercer estadio larvario en PBS y se fijaron en Formaldehído 4% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras tres lavados de 15 minutos en PBS-0,3% Tritón, se bloquearon con PBS + 0,3% Tritón + 1% BSA+ 250mM NaCl durante 30 minutos y se incubaron con los anticuerpos primarios durante una noche a 4 °C. Tras varios lavados en PBS-0,3% Tritón, se incubaron con los anticuerpos secundarios durante 2 horas a temperatura ambien-

te. Los discos imaginales se montaron en Vectashield® (Vector Laboratories™). Las imágenes de microscopía confocal fueron capturadas usando un microscopio confocal Zeiss LSM510™ y se procesaron con los programas ImageJ 1.38 y Metaview™.

3.4.-Preparaciones de alas adultas

Las alas adultas se preservaron en etanol y se montaron en portas en un medio de montaje compuesto por Ácido láctico/etanol (6:5). Las imágenes se captaron con una cámara digital Spot acoplada a un microscopio Zeiss Axioplan™.

3.5.-Cuantificación del tamaño de ala, y del número y tamaño de sus células

Para calcular el tamaño de las alas adultas se fotografiaron 15 alas de hembras correspondientes a los diferentes genotipos a cuantificar, a un aumento de 5X, y se midió su área en píxeles con el programa Adobe-Photoshop™ CS4. Para calcular el tamaño celular se tomaron 15 imágenes de la región E dorsal del ala (Fig. I4 y R3) y se contó el número de células en un área constante con el programa Adobe-Photoshop™ CS4. El número total de células se calculó usando la densidad celular y el tamaño del ala.

3.6.-Cálculo del índice mitótico en discos imaginales

Se cuantificó el número de células en mitosis, detectadas por la expresión de Fosfo-Histona 3 (PH3), en los compartimentos anterior y posterior del disco imaginal de ala en el tercer estadio larvario, y el tamaño de los correspondientes compartimentos. Se utilizó como índice mitótico la media de los valores de los cocientes entre el número de células en mitosis y el área del compartimento correspondiente. Las imágenes utilizadas para realizar este análisis fueron proyecciones de 20 planos focales de un mismo disco. Se utilizó un mínimo de 10 discos por genotipo estudiado.

4.-TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

4.1.-Generación de individuos transgénicos

Para generar la construcción UAS-MAP4K3 fue realizada a partir el ADNc RH10407 (BDGP), se usó como molde para una reacción de PCR utilizando los siguientes oligos:

UAS-MAP4K3 sentido 5'-TATGTCGACGATTTGTGGGCTGCG-3'

UAS-MAP4K3 antisentido 5'-GAAGCGGCCGCTGCACTAAGCTAGAG-3'

El fragmento resultante fue purificado, digerido con las enzimas de restricción *Sall* y *NotI* (sus dianas se indican subrayadas en los oligos) (Promega™) y clonado en el vector pUAS (Brand and Perrimon, 1993) utilizando Ligasa T4.

Para generar las construcciones UAS-MAP4K3ΔCNH y UAS-MAP4K3ΔK el cADN RH10407 (BDGP) se usó como molde para una reacción de PCR utilizando los siguientes oligos:

UAS-MAP4K3ΔCNH

UAS- MAP4K3ΔCNH sentido 5'-CACCCGTTGACGAAGTGCATGTG-3'

UAS- MAP4K3ΔCNH antisentido 5'-TTAGGTGTTGTTTCAGCAGATCC-3'

UAS-MAP4K3ΔK:

UAS-MAP4K3ΔK antisentido 5'-CACCATGCCCAACCCGCAGTTCTACTA-3'

UAS-MAP4K3ΔK sentido 5'-CCCAACAAACCGTATCATCC-3'.

Los fragmentos resultantes fueron purificados y clonados direccionalmente en el vector pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen™) y posteriormente subclonados en el vector pTWF mediante una reacción con LR Clonase II (Invitrogen™), siguiendo las instrucciones de Invitrogen. Para generar líneas transgénicas portadoras de las construcciones UAS-MAP4K3, UAS-MAP4K3ΔCNH y UAS-MAP4K3ΔK se realizaron puestas de 30 minutos de la estirpe yw. El corion de los embriones recolectados se eliminó sumergiéndolos durante 2 minutos en agua con lejía al 50%. Los embriones decorionados se lavaron con agua, se alinearon en un portaobjetos con cinta adhesiva de doble cara y se microinyectaron con 6 µg de la construcción UAS junto con 1,6 µg del vector pUC Δ2-3 como fuente de transposasa. A las 48 horas se recogieron larvas que dieron lugar a moscas adultas que se cruzaron con moscas de genotipo yw. De la progenie resultante se seleccionaron las moscas con fenotipo w⁺. Para generar líneas estables y discernir en qué cromosoma se había insertado la construcción UAS se empleó la estirpe w; CyO/I^f; MKRS/TM6b.

4.2.- Mapeo molecular de las mutaciones inducidas en el gen *Map4k3*

Para identificar las mutaciones generadas en los revertientes *EP-704^{IV2}*, *EP-704^{2G1}* y *EP-704^{4T1}* se extrajo ADN genómico de moscas *EP-704*/Df(2R)6069*, y se utilizó como molde para amplificar las regiones genómicas codificantes adyacentes al sitio de inserción del elemento P-GS. Se diseñaron 10 pares de oligonucleótidos que amplifican regiones de entre 500pb y 1 Kb.

Exón 1: TGCATCTCGATCCACAAAAG y AGTTT^{*}TTGCCTT^{*}TCCCT^{*}TCC

Exón 2: AAAGCCACCACATAATCTCCA y CCCCGCCTT^{*}TAAATCTGACT

Exones 3-4: TTAGCTGAGGCAGCAAAACC y TAAAGGCAAAAGGTGCCAAG

Exones 5-6: GTGAAGGTCCATTTCCTCGAA y AACCCGTTTCGCAAGTAAGA

Exón 7: CGT^{*}TAAATTTGGGCGTTAGGA y TTGCGTGAAAATATGGTGGA

Exón 8: GCTCAACATCTCGGCTCTCT^{*} y CATTATT^{*}CATGGCCACATCG

Exón 8: ATGCCGACGACGATGAAC^{*}T y TACCTGAACCCCATTTGATG

Exones 9 and 10: TGATTACCGGCATGAGAACA y CTCCGGGATCT^{*}TGT^{*}TCATGT

Exón 11: TGGGTACACGAT^{*}TCT^{*}TGCAT^{*} y ATGGCGTCATATTCCAGGTC

Exones 12-14: GCTGGAGCTGATCAACATGAA y TGTGTGGTGAACCGGATTAT

Para cada par de oligonucleótidos se realizaron en paralelo dos reacciones de PCR con las mismas condiciones. Cada producto de PCR fue clonado en el vector pGEM-T-Easy (Promega™) y se realizaron preparaciones de ADN de dos clones independientes de cada producto clonado mediante el Sistema de Purificación de ADN de Promega. Cada clon fue secuenciado utilizando los oligonucleótidos SP6 y T7, de forma que para cada región amplificada se obtuvieron 8 secuen-

cias, las cuales se alinearon con la secuencia de ADN genómico silvestre (Free Workbench3). Las mutaciones fueron identificadas como aquellos cambios de nucleótido detectados en todas las secuencias obtenidas de una misma región.

4.3.-Generación de anticuerpos

Para generar la proteína de fusión de MAP4K3 a GST se procedió al clonaje del dominio de MAP4K3 comprendido entre los aminoácidos 379 a 696 de la isoforma B unido a una secuencia GST en el plásmido pGEX-4T1 (Pharmacia™). La amplificación del fragmento de MAP4K3 se realizó por PCR utilizando como molde el ADNc RH10407 (BDGP) y utilizando los siguientes oligos, a los que se añadieron las dianas *Sall* y *NotI* (subrayadas) en sus extremos 5' y 3', respectivamente, así como un codón de terminación en el oligo antisentido (en negrita):

-MAP4K3 sentido: 5'- GGGGGGTCGACGCTGACGAAGAATCCGAAGA-3'

-MAP4K3 antisentido: 5'- GGGGGGCGGCCGCGT**CA**TTGGAGATGGGTCGAGGT-3'

El ADN amplificado se clonó en fase en los sitios *Sall* y *NotI* del vector pGEX-4T1. Tras confirmar el clonaje, los fragmentos se secuenciaron en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI), comprobándose que no se había introducido ninguna mutación durante el proceso de amplificación.

La proteína de fusión GST-MAP4K3 se purificó según el método estándar que describimos brevemente. Primero se transformó la construcción MAP4K3-pGEX-4T1 en bacterias competentes BL21 de *E.coli* que se crecieron durante toda la noche a 37° C en medio LB con ampicilina 100 µg/ml. Posteriormente, las bacterias se inocularon con medio LB suplementado con glucosa y se dejaron crecer hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6 a una longitud de onda de 600 nm. La expresión de la proteína se indujo con la adición al medio de IPTG 1mM durante 3-5 h a 37°C. Las bacterias se sedimentaron por centrifugación y se lisaron en Tris-HCl 10 mM pH8, Tritón X-100 1%, Lisozima 2 mg/ml en presencia de los inhibidores de proteasas bacitracina (10µg/ml), benzamidina (10µg/ml), aprotinina (1,4µg/ml), PMSF (200 µM) y del inhibidor de tripsina (10µg/ml). El lisado bacteriano se sonicó y clarificó, y el sobrenadante se cargó en una columna de Glutation-Sepharosa 4B (Amersham Biosciences™) (50:4) y se dejó pasar durante un mínimo de 3 horas. Tras lavar la columna con PBS las proteínas unidas a Glutation-sepharose 4B se eluyeron con 50 mM Tris-HCl pH8, 5 mM Glutation reducido (Sigma™). La pureza de la proteína obtenida se comprobó en un gel desnaturalizante de SDS-poliacrilamida al 10% y la concentración se estimó mediante el método de Lowry (1951), utilizando albúmina de suero bovino como estándar para construir la recta patrón.

Para obtener el anticuerpo contra el fragmento de MAP4K3 se sometió a cuatro ratas (*Ratus norvegicus*) a una serie de inmunizaciones con la proteína. En un primer inóculo se utilizó una emulsión de 900 µg de proteína con el coadyuvante de Freund completo (Sigma Inmuno Chemicals™) (relación 1:1). Tras este primer proceso de inmunización se realizaron hasta tres más, en este caso preparando la emulsión con coadyuvante de Freund incompleto (Sigma Inmuno Chemicals™), inoculando cada 15 días. Previamente a los procesos de inmunización, se realizó una extracción de sangre preinmune como control negativo. Tras el sangrado de los animales, se obtuvo el suero por formación de un coágulo a 4°C O/N y el sobrenadante se guardó a -20°C añadiéndole azida sódica 0.02% (apartado 11.12.3. *Currents Protocols in Molecular Biology*).

4.4.-RT-PCR cuantitativa

El ARN total se obtuvo a partir de 20 larvas WT de tercer estadio larvario y 20 larvas EP-704 homocigóticas. Los homogenizados se realizaron utilizando TRIZOL reagent RNA (GibcoBRL™), y se utilizó cloroformo para extraer, isopropanol para precipitar, etanol para lavar y agua (DEPC; Invitrogen™) para resuspender el RNA, siguiendo siempre las instrucciones de la casa comercial. Se utilizaron reactivos y material libres de ARNasas. Se utilizaron 0,7 µg de RNA como molde en una reacción de retro-transcripción usando el protocolo y el kit GeneAmp RNA PCR (Applied Biosystems™) y utilizando como cebador el oligo (dT)₁₂₋₁₈ y la enzima Transcriptasa reversa MuLV, de acuerdo con las recomendaciones de la casa comercial.

La RT-PCR en tiempo real fue realizada siguiendo los protocolos del kit SYBR green PCR master mix en un ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems™). Los oligos para la PCR en tiempo real fueron 5'-TCC CAA GCA GCA CAA GAA GA-3' y 5'-CTC TCC AAG GCC ACA ACC TT-3' para MAP4K3 y 5'-CGG ATC GAT ATG CTA AGC TGT-3' y 5'-CGA CGC ACT CTG TTG TCG-3' para RP49 (proteína ribosomal 49 que se utilizó como control endógeno para las cuantificaciones). Tanto la retro-transcripción como la PCR en tiempo real fueron realizados por el servicio de genómica del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, CSIC-UAM, Madrid.

5.-TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

5.1.- Ensayos de interacción *in vitro*

Las proteínas Rheb (GH10361), RagA (GH4846), RagC (GH16429) y dTOR (RE49094) fueron generadas a partir de su ADNc (BDGP) con el kit *TNT T7 coupled Reticulocyte Lysate Systems*® (Promega™) y marcadas con Met-[S³⁵]. Una vez obtenidas estas proteínas marcadas con Met-[S³⁵] se realizó el ensayo de interacción *in vitro* con la proteína de fusión MAP4K3-GST inmovilizada en resina de Glutathion-Sepharosa 4B. Para ello, 1 µg de las proteínas transcritas *in vitro* se incubaron con 50 µl de MAP4K3-GST y 200 µl de tampón de unión (20mM TRIS-HCl pH8, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5% Nonidet P40, 0,01% BSA y los inhibidores de proteasas: bacitracina 10 µg/ml, benzamidina 10 µg/ml, aprotinina 1,4 µg/ml, PMSF 200 µM, inhibidor de tripsina 10 µg/ml) durante 2 horas a 4° C en una noria. Posteriormente, centrifugamos y lavamos el precipitado 4 veces con el tampón de lavado (Tris-HCl 20mM pH7,4, NaCl 300mM, 2mM EDTA pH7,4, Tritón X-100 0,05 %) para eliminar todo lo que no se haya unido específicamente a la proteína MAP4K3-GST. Finalmente, la resina junto a las proteínas unidas se cargaron en un gel de Poliacrilamida-SDS del porcentaje adecuado según el tamaño de la proteína problema. Una vez resuelto, el gel fue secado y expuesto a autorradiografía para confirmar la presencia de las proteínas sintetizadas *in vitro*.

5.2.-Western-blot

Con el empleo de esta técnica se realizaron estudios para comprobar la especificidad del anticuerpo contra MAP4K3 que generamos en ratas. La expresión de MAP4K3 fue inducida en células S2 y a partir de extractos celulares se resolvió en geles de SDS-poliacrilamida junto

con patrones de peso molecular comerciales (Bio-RadTM). Las proteínas así separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm (Transblot de Bio-Rad) mediante transferencia líquida en tampón carbonato pH10 (Na_2CO_3 3mM, NaHCO_3 10 mM, 20% metanol pH10) durante 75 min. a 50V. Después de teñir la membrana con rojo Ponceau, para comprobar la transferencia de proteínas a la membrana, ésta se incubó durante una hora a temperatura ambiente en medio TBS (Tris-HCl 10mM pH7,5, NaCl 150mM) suplementado con leche en polvo desnatada (Molico) al 5% o BSA al 3%, con objeto de bloquear los posibles sitios de unión inespecífica. Tras descartar el medio de bloqueo, la membrana se incubó durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos anti-MAP4K3 (1:200) y anti β -tubulina (1:1000, Hybridoma Bank) diluidos en medio TBS con 3% de BSA. La membrana se lavó tres veces (3x15min.) con TBS-Tween 20 al 0,15 % y se incubó con los anticuerpo secundarios (anti-rata y anti-ratón) durante dos horas a temperatura ambiente. Tras la incubación se realizaron tres lavados de 15 minutos con TBS-Tween 20 al 0,15 %. Finalmente, para el revelado se empleó un método quimioluminiscente en el que la peroxidasa, acoplada al anticuerpo secundario, cataliza la oxidación del sustrato luminol en presencia de H_2O_2 (ECL, Amersham).

6.-TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS S2

Para los ensayos de transfección se empleó la línea celular Schneider (S2) derivada de tejido imaginal de *Drosophila*. Para su propagación y mantenimiento las células se crecieron en un medio insect X-press (LonzaTM) (suplementado con 10% de suero fetal bovino SigmaTM), aminoácidos no esenciales, glutamina y antibióticos a 25°C. Para la transfección de las células S2 se utilizó el kit Amaxa[®] Cell Line Nucleofector V (LonzaTM). Se sembró un número de células suficiente para obtener un 80% de confluencia en el momento de transfectar en un medio insect X-Press (LonzaTM) libre carente de antibióticos y suero. Se recogieron las células y centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de eliminar el sobrenadante completamente, se resuspenden las células en 100 μl de la solución Nucleofector[®] (LonzaTM) y se añade 10 μg de la construcción Act-Gal4 (control), y 5 μg de la construcción Act-Gal4 + 5 μg de la construcción UAS-MAP4K3 (ensayo de especificidad). La mezcla fue introducida en una cubeta Nucleofector[®] (LonzaTM) donde se produjo la electroporación utilizando el programa G-030 especificado por la casa comercial LonzaTM. Inmediatamente después se añadieron 500 μl de medio de cultivo X-PRESS-10% FCS a la cubeta y la mezcla fue transferida a placas de cultivo. Las células se mantuvieron en un incubador a 25°C durante 24 horas. Pasado ese tiempo, se recogieron las células, se lavaron con PBS y se lisaron en 500 μl de medio RIPA (50mM Tris-HCl pH8, 150mM NaCl, 1% NP40, 0,5% DOC, 0,1% SDS, 5mM EGTA, 5mM EDTA) que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas bacitracina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), benzamidina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), aprotinina (1,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$), PMSF (200 μM) y del inhibidor de tripsina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). En todo momento, la preparaciones se mantuvieron a 4°C. Las células se sonicaron y se centrifugaron para recoger el sobrenadante que contenía los extractos proteicos, que se resolvieron en un gel de acrilamida al 10%.

7.-ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Se disectaron 25-30 larvas de tercer estadio larvario en PBS a 4°C. Se recogieron los discos imaginales de ala en un eppendorf con PBS a 4°C. Los discos se acumularon en el fondo del eppendorf por centrifugación y se eliminó el PBS. Posteriormente se añadieron 300 µl de tripsina (Trypsin-EDTA Sigma T4299) + 0,5 µl de Hoescht (Hoescht 33342, Trihydrochloride Trihydrate H3570, Molecular Probes™) y se incubó la solución a 28°C en agitación suave durante 40 min. Durante la incubación cada 10 min se pipetearon suavemente los discos para disgregar las células. Para parar la reacción de tripsina sobre los discos se añadieron 200 µl de PBS + FCS (Fetal Bovine Serum Sigma™ 9665) 1% a 4°C, y la mezcla se pipeteó suavemente, se centrifugó a 3500 rpm a 4°C durante 5 min y se resuspendió en 300 µl de PBS + FCS (Fetal Bovine Serum Sigma™, Cat N° 9665) 1% a 4°C. La toma de muestras se llevó a cabo en un equipo FACS Vantage 2 (Becton Dickinson™). Al menos tres experimentos independientes se realizaron por genotipo, obteniendo los perfiles de ciclo celular en cada experimento con poblaciones de más 10.000 células. La temperatura de ejecución de todos los experimentos fue de 25°C. Las edades de disección fueron 96-120 horas AEL (después de la puesta de los huevos). Los perfiles de ciclo celular y los análisis de las poblaciones celulares se realizaron con el programa FlowJo 7.5. Los genotipos analizados fueron:

-*nub-Gal4; UAS-GFP*

-*nub-Gal4/UAS-MAP4K3; UAS-GFP*

8.- EXPERIMENTOS DE IRRADIACIÓN

Larvas de tercer estadio larvario de los genotipos estudiados (*w; en-Gal4 UAS-GFP/+; puc-LacZ/TM6b* y *w; en-Gal4 UAS-GFP/UAS-MAP4K3-i; puc-LacZ/TM6b*) fueron irradiadas con una dosis final de 1500R en un aparato Philips X-Ray machine. Los discos imaginales fueron disectados a las 8 horas de la irradiación y teñidos con anti-bGal y anti-MAP4K3. Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron con un microscopio confocal Zeiss LSM510, y consistieron en proyecciones de 50 planos focales de cada disco. Se utilizaron un mínimo de 10 discos por genotipo estudiado para medir la intensidad de fluorescencia del canal rojo (expresión de *puc-LacZ*) con el programa ImageJ1.38 (NIH).

9.-PESO DE *DROSOPHILA*

Las moscas se durmieron con CO₂ y posteriormente se pesaron en una balanza de precisión Sartorius™ Basic en grupos de 4.

10.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresan como la media \pm la desviación estándar de la media (\pm SEM). Todos los datos fueron almacenados y calculados utilizando el programa Microsoft Excel 2008. Las figuras fueron tratadas con los programas ImageJ1.38 y Adobe-PhotoshopTM CS4.

IV. RESULTADOS

El tamaño final de un órgano está determinado por el número de células que lo componen y por el tamaño de éstas. A su vez, el número de células depende del balance entre la proliferación y la muerte celular. Nuestro interés se centra en identificar genes que modifiquen el tamaño del ala sin que ni su forma ni su patrón de diferenciación se vean alterados. Las principales rutas de señalización que afectan de manera específica al control del tamaño durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster* son las de la Insulina/TOR y JNK.

La vía de señalización InR/TOR está activa en todas las células del organismo y tiene un papel fundamental durante el crecimiento de los órganos, afectando tanto al número como al tamaño de las células. De esta manera, si aumentamos en todo el ala la señalización de ruta InR/TOR en el disco de ala (*nub-Gal4/UAS-Pten-i*) causamos un aumento de tamaño de las alas adultas, provocado tanto por el aumento del número como del tamaño de las células (Fig. R1B y Gráfica R1F). En cambio, si disminuimos los niveles de señalización de la ruta en el mismo dominio espacial (*nub-Gal4/UAS-Dp110-i*), obtenemos unas alas adultas de tamaño reducido formadas por menos células de lo normal que además son más pequeñas (Fig. R1C y Gráfica R1F).

La vía de señalización JNK afecta de manera distinta a diferentes órganos de *Drosophila melanogaster* (Galko y Krasnow, 2004; Igaki et al., 2006; Jacinto et al., 2002; Kallio et al., 2005; Pastor-Pareja et al., 2004; Pastor-Pareja et al., 2008; Shen y Dahmann, 2005; Stronach y Perrimon, 2002; Zeitlinger y Bohmann, 1999) y su función durante el crecimiento de un órgano solamente está relacionada con el número de células. En el caso del desarrollo del ala, esta ruta regula la eversión del disco (Pastor-Pareja et al., 2004), y está también encargada de eliminar mediante apoptosis a las células que han sido dañadas tras sufrir diferentes formas de estrés tales como heridas en el tejido, exposición a radiaciones ionizantes o a temperaturas extremas. La activación anormal de la ruta JNK en el ala (*nub-Gal4/UAS-Bsk**) causa una disminución de tamaño del ala provocado por una disminución del número de células (Fig. R1D y Gráfica R1F). En estos casos se observa en el disco de ala la presencia de células en apoptosis (Fig. R1E).

Una vez conocidas las consecuencias de modificar la actividad de las rutas InR y JNK en el ala, buscamos en una colección de líneas P-UAS (Molnar et al., 2006) aquellas que en combinación con *nub-Gal4* generaban fenotipos similares. De un total de 300 combinaciones seleccionamos la línea *EP-704*, que en combinación con *nub-Gal4* generaba alas de menor tamaño al normal sin afectar al patrón de venas.

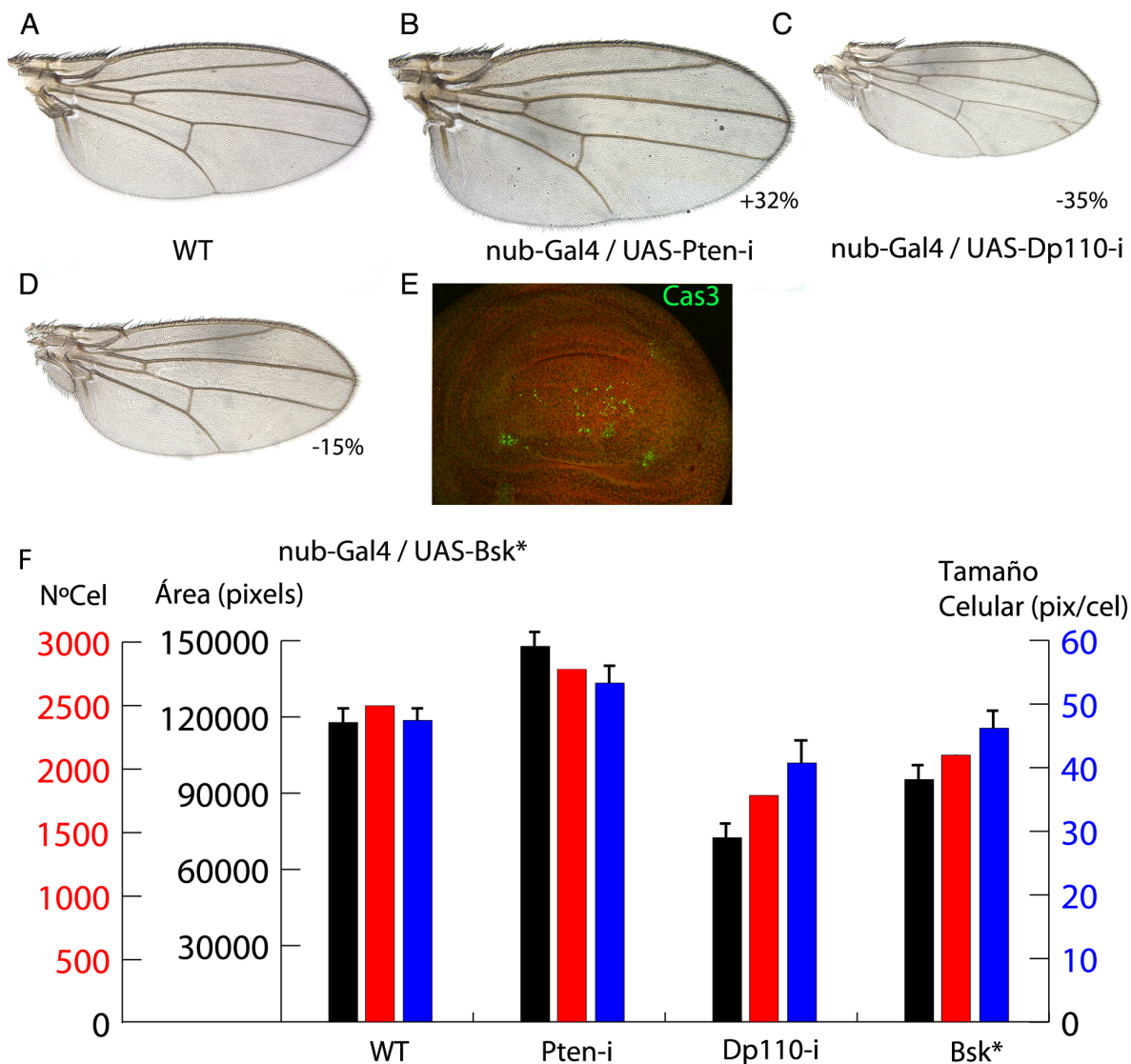


FIGURA R1: Consecuencias de la alteración de la actividad de las rutas de señalización Insulina y JNK

A) Ala silvestre. **B)** Activación de la ruta InR en alas de genotipo *nub-Gal4/UAS-Pten-i*. Su mayor tamaño está provocado tanto por el aumento del número como del tamaño de las células del ala. La línea *nub-Gal4* se expresa durante el 2º y 3º estadio larvario en las regiones del disco imaginal que darán lugar al ala y a la bisagra. **C)** Reducción de la ruta InR en alas de genotipo *nub-Gal4/UAS-Dp110-i*. Su menor tamaño se debe a la reducción del número y tamaño de las células. **D)** Activación de la ruta JNK en alas de genotipo *nub-Gal4/UAS-Bsk**. El ala es más pequeña debido a la reducción del número de células. **E)** Células apoptóticas visualizadas por la expresión de Cas3* (verde) en un disco del ala de 3º estadio larvario de genotipo *nub-gal4/UAS-Bsk**. **F)** Representación gráfica de los valores numéricos de tamaño del ala (barras negras), número de células (barras rojas) y tamaño de células (barras azules) de los diferentes fenotipos ilustrados en A-D.

1.-IDENTIFICACIÓN DEL GEN *CG7097*

1.1.-Fenotipo de combinaciones *Gal4/EP-704*

Para caracterizar en mayor detalle los fenotipos causados por combinaciones entre la línea *EP-704* y diferentes líneas *Gal4*, en primer lugar cuantificamos las reducciones de tamaño en diferentes combinaciones (ver Materiales y Métodos). Encontramos que la reducción del tamaño del ala es mayor cuanto mayor es el dominio de expresión de la línea *Gal4* utilizada en combinaciones con *EP-704*. Así, utilizando *dpp-Gal4*, *sal^{EP}-Gal4* u *omb-Gal4* aparecen reducciones del tamaño del ala de un 13%, 19% y 25%, respectivamente (Fig. R2B, C y D). La reducción de tamaño es mayor en combinaciones del *EP-704* con las líneas *638-Gal4*, *179-Gal4* o *nub-Gal4*, donde obtenemos reducciones del 28%, 36% y 22% respectivamente (Fig. R2E, F, G). En estos casos, también observamos fenotipos de alteración del patrón de venas, que consisten en la aparición de pequeñas extravenas (Fig. R2).

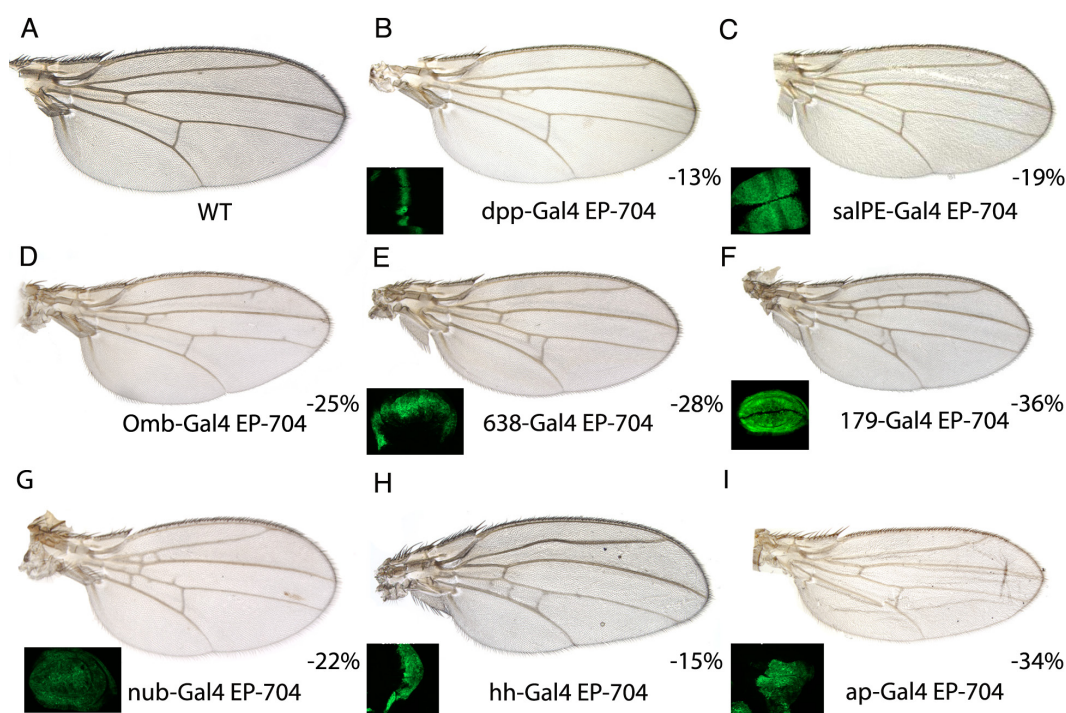


FIGURA R2: Fenotipos obtenidos en combinaciones de la línea EP-704 y diferentes líneas *Gal4*

A) Ala silvestre. B) *dpp-Gal4/EP-704* C) *sal^{EP}-Gal4/EP-704* D) *omb-Gal4/EP-704* E) *638-Gal4/EP-704* F) *179-Gal4/EP-704* G) *nub-Gal4/EP-704* H) *hh-Gal4/EP-704* I) *ap-Gal4/EP-704*. El porcentaje de reducción del tamaño del ala de cada combinación respecto del ala silvestre está anotado al pie de cada imagen. Junto a cada ala se incluye un inserto donde se muestra el dominio de expresión en el disco imaginal de ala de cada línea *Gal4* utilizada (*Gal4/UAS-GFP*), revelado por la presencia de GFP en verde.

También obtenemos una reducción de tamaño localizada a la región de sobre-expresión cuando utilizamos líneas *Gal4* que se expresan tanto en el compartimento posterior como en el

dorsal, en combinaciones con *hb-Gal4* (15%) o *ap-Gal4* (34%) (Figura R2H e I). En ambos casos podemos apreciar una “acomodación” de la región no afectada, cuyo tamaño es también menor al que le correspondería en un ala normal. Finalmente realizamos una serie fenotípica comparando el tamaño de las alas en individuos con un número variable de copias de la línea *nub-Gal4* o del *EP-704* (Fig. R3). Como podemos observar, cuanto más aumentemos los niveles de expresión del gen afectado por la inserción *EP-704* más fuerte es el fenotipo de reducción de tamaño, yendo de 22% al 44% de reducción en las condiciones más fuertes de sobre-expresión (Fig. R3 y Tabla R1).

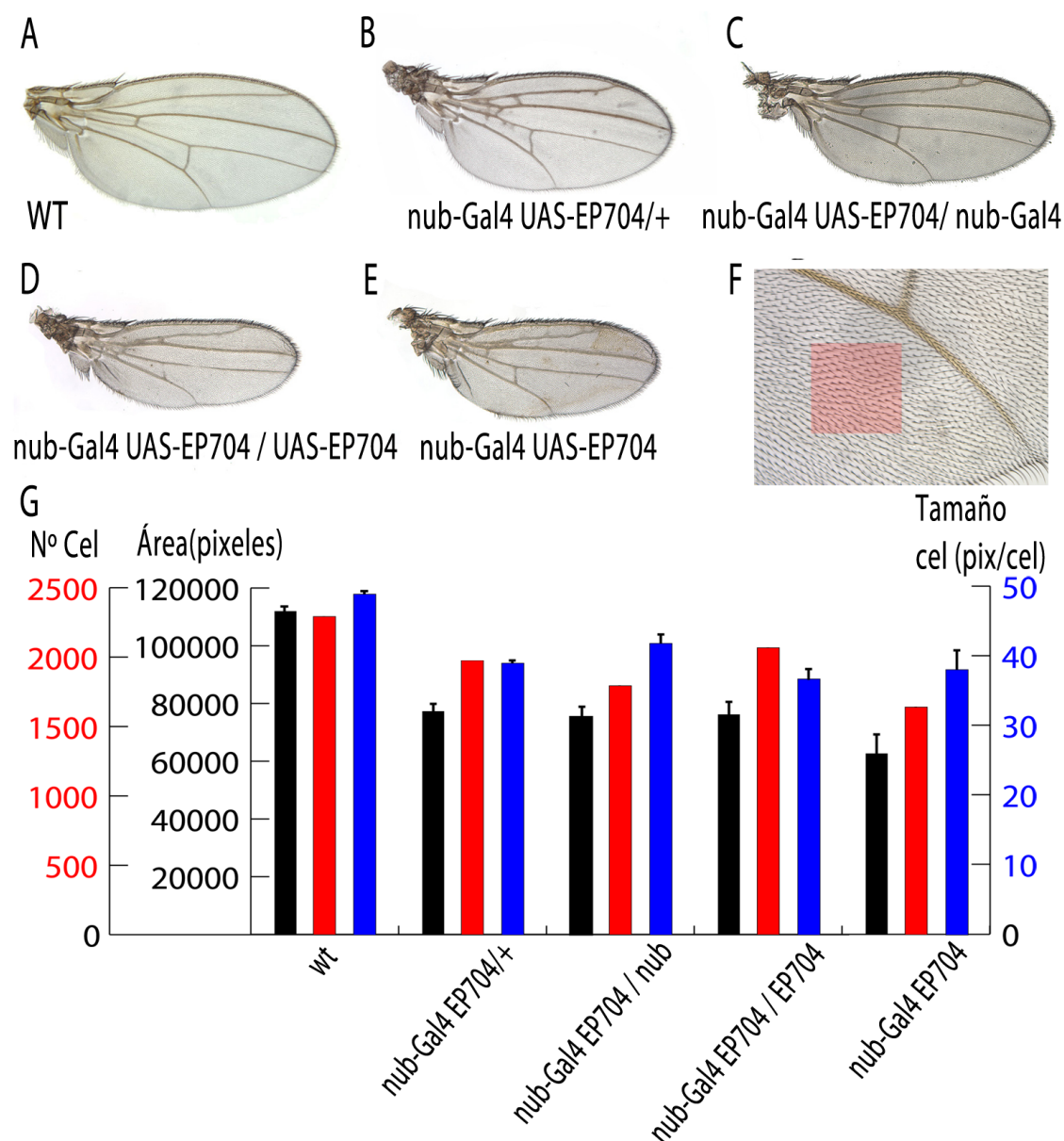


FIGURA R3: Serie fenotípica de la línea EP-704

A) Ala silvestre (wt). **B)** *nub-Gal4 EP-704 / +*. **C)** *nub-Gal4 EP-704 / EP-704*. **D)** *nub-Gal4 EP-704 / nub-Gal4* **E)** *nub-Gal4 EP-704 / nub-Gal4 EP-704* **F)** Detalle de la región E dorsal del ala donde fueron contadas las células (sombreado en rojo). **G)** Representación gráfica de los valores numéricos del tamaño del ala (barras negras), número de células (barras rojas) y tamaño de células (barras azules) de los diferentes genotipos analizados.

Como los factores que determinan el tamaño final de un órgano son el número de células y el tamaño de las mismas, decidimos analizar de una manera más detallada la naturaleza del fenotipo provocado por la sobre-expresión de la línea *EP-704*. Para ello, cuantificamos estos parámetros en las alas y en los correspondientes discos imaginales de la combinación *nub-Gal4/EP-704*. El tamaño y número de células fue calculado contando los tricomas (cada célula del ala adulta diferencia un tricoma) en la parte dorsal de la región E de las alas (cuadro rojo en la figura R3F), tal como describimos en Materiales y Métodos. Como hemos visto, el aumento de los niveles de sobre-expresión conlleva una progresiva disminución del tamaño del ala. Esto es debido a un descenso del número y tamaño de las células. Esta reducción en el número de células varía de un 15% en alas heterocigóticas para la combinación *nub-Gal4/EP-704* a un 28% para alas homocigóticas de la misma combinación (Fig. R3, Gráfica R3G y Tabla R1). De un mismo modo, vemos que la reducción del tamaño de las células sigue la misma dinámica que en el parámetro anterior, variando de un 15% a un 28% en las condiciones heterocigótica y homocigótica, respectivamente (Fig. R3, Gráfica R3G y Tabla R1).

	Área alas (píxeles)	t=	Número de células en región E dorsal	t=	n° Células total	Tamaño Células (pix/cel)
wt	117808 (+/-2792)		69 (+/-5)		2489	47,33 (+/-2)
nub/+	111869 (+/-2292)	2,30E-05	66 (+/-2)	1,62E-01	2292	49,02 (+/-2,1)
nub/EP704	77223 (+/-7374)	6,10E-08	83 (+/-4)	1,93E-08	1976	39,09 (+/-1,3)
nub EP704/nub	75237 (+/-7132)	7,34E-05	77 (+/-2)	2,34E-06	1794	41,94 (+/-2,5)
nub EP704/EP704	76120 (+/-7794)	6,45E-04	88 (+/-7)	3,25E-04	2067	36,82 (+/-2,6)
nub EP704/nub EP704	62599 (+/-8490)	2,34E-06	85 (+/-2)	7,54E-04	1640	38,16 (+/-3)

TABLA R1: Valores numéricos del tamaño de ala, número de células y tamaño celular de la serie fenotípica de la línea *EP-704*.

Las variaciones observadas en el número de células podrían deberse a una disminución del ritmo de proliferación o a la aparición de muerte celular. Observamos que los discos imaginales de ala de tercer estadio larvario de la combinación *nub-Gal4/EP-704* presentan altos niveles de expresión de Caspasa 3 activada (Fig. R4A), indicando la presencia masiva de células en apoptosis en la región de sobre-expresión.

A modo de resumen, podemos concluir que el fenotipo de reducción de tamaño del ala observado en la combinación *nub-Gal4/EP-704* es debido a una disminución tanto del número de células como del tamaño de estas, ambas causas compatibles con una reducción en la actividad de

la vía InR/TOR. Por otra parte la existencia de muerte celular podría ser debida a la activación de la ruta JNK. Finalmente, estudiamos si en otros tejidos la expresión de los genes afectados por la línea *EP-704* causaba fenotipos compatibles con alteraciones de las vías InR ó JNK. Para ello utilizamos la línea Gal4 específica de cuerpo graso *ppl-Gal4* en combinación con la inserción *EP-704*. El cuerpo graso de *Drosophila* es el equivalente al hígado de los mamíferos, y su morfología es muy sensible a variaciones en los niveles de disponibilidad de alimento y por tanto a la actividad de la vía InR/TOR. Observamos que en la combinación *ppl-Gal4/EP-704* se produce un fenotipo de fusión de vesículas lipídicas, (Fig. R4C comparar con R4B), que es característico de una falta de aminoácidos en el organismo o de una reducción en la vía TOR en las células del cuerpo graso.

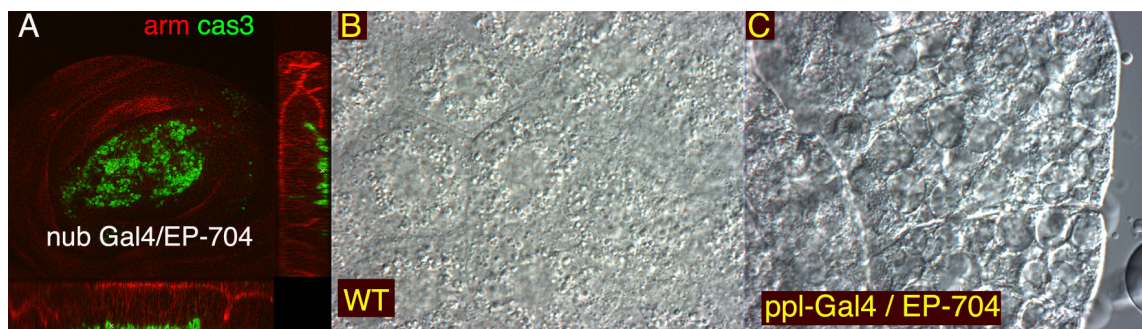


FIGURA R4: Fenotipo producido por la línea EP-704 en el disco imaginal de ala y en el cuerpo graso

A) Expresión de Caspasa 3 activada (Cas3, verde) y Armadillo (arm, rojo) en un disco imaginal de ala de tercer estadio larvario *nub-Gal4/EP-704*. **B)** Cuerpo graso silvestre (WT). **C)** Fusión de vesículas lipídicas característico de la bajada de actividad de la ruta TOR observado en el cuerpo graso de genotipo *ppl-Gal4/EP-704*.

1.2.-Identificación del gen responsable del fenotipo de sobre-expresión.

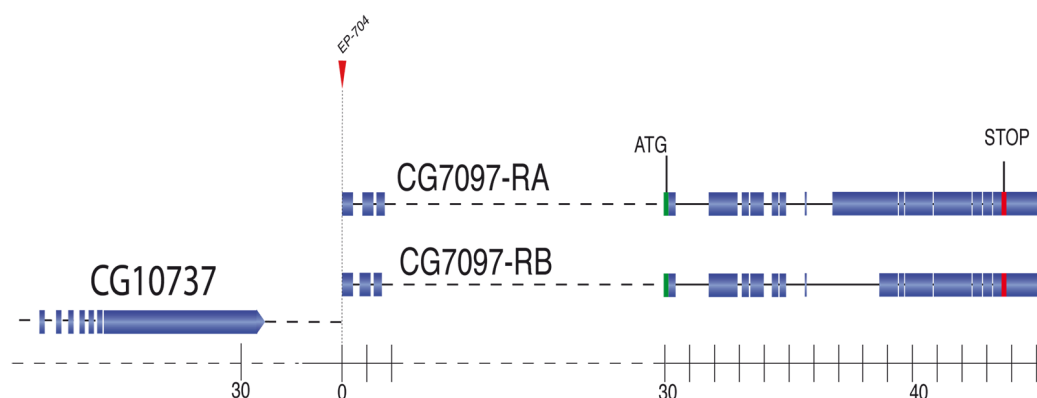


FIGURA R5: Representación esquemática del gen *CG7097* y posición de la inserción *EP-704*

La línea *EP-704* (triángulo rojo) está insertada en la región 5'UTR del gen *CG7097*, que está localizado en el brazo cromosómico 2R.

La línea *EP-704* está insertada en la región 5'UTR del gen *CG7097*, localizado en el brazo cromosómico 2R (Fig. R5). En las proximidades de la inserción también se encuentra el gen *CG10737*, aunque su sobre-expresión no sería posible ya que su dirección de transcripción es opuesta a la del elemento P-UAS. Por tanto, el gen *CG7097* es el principal candidato a ser sobre-expresado en las combinaciones entre la inserción *EP-704* y líneas *Gal4*, y a ser el responsable de los fenotipos de reducción de tamaño característicos de estas combinaciones.

Para confirmar la expresión de *CG7097* dependiente de *Gal4* en individuos *EP-704*, realizamos una hibridación in situ en discos imaginales de ala de genotipo *sal^{EPv}-Gal4/EP-704* (ver Materiales y Métodos) con una sonda antisentido específica para el gen *CG7097* (Fig. R6B). Como se puede apreciar, los niveles del ARNm aumentan en la zona central del disco imaginal, confirmando así que en las combinaciones *EP-704/Gal4* el gen *CG7097* se sobre-expresa.

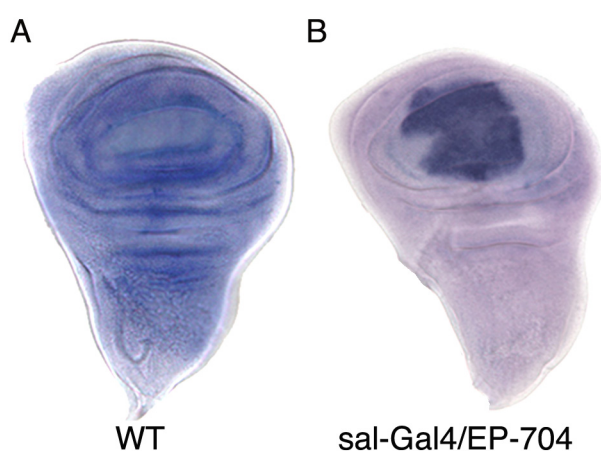


FIGURA R6: Expresión del gen *CG7097* en discos imaginales de ala

A) Disco imaginal de ala de tercer estadio mostrando la expresión generalizada del gen *CG7097* tras hibridación in situ con una sonda de ARN antisentido. **B)** Disco imaginal de ala de tercer estadio de genotipo *sal^{EPv}-Gal4/EP-704*. La expresión del ARN *CG7097* se encuentra muy aumentada en el dominio de expresión de la línea *sal^{EPv}-Gal4*.

Para averiguar si *CG7097* es el responsable de la reducción del tamaño del ala estudiamos el fenotipo de diferentes combinaciones *UAS-CG7097/Gal4*, y encontramos que estos fenotipos son idénticos a los observados en las combinaciones *EP-704/Gal4* (Fig. R7B comparar con C, D comparar con E). Además, observamos que los fenotipos *EP-704/Gal4* son suprimidos cuando en estas combinaciones incluimos un ARN interferente dirigido contra el gen *CG7097* (*nub-Gal4 EP-704/UAS-CG7097-i*; Fig. R7F). Con estos resultados concluimos que el gen *CG7097* es el causante de los fenotipos de reducción del tamaño del ala observados en las combinaciones entre *EP-704* y líneas *Gal4*. Además, estos fenotipos son debidos a la sobre-expresión del gen *CG7097* en células que ya lo expresan, dado que en individuos silvestres, la expresión de *CG7097* se detecta en todas las células de los discos imaginales (Fig. R6A)

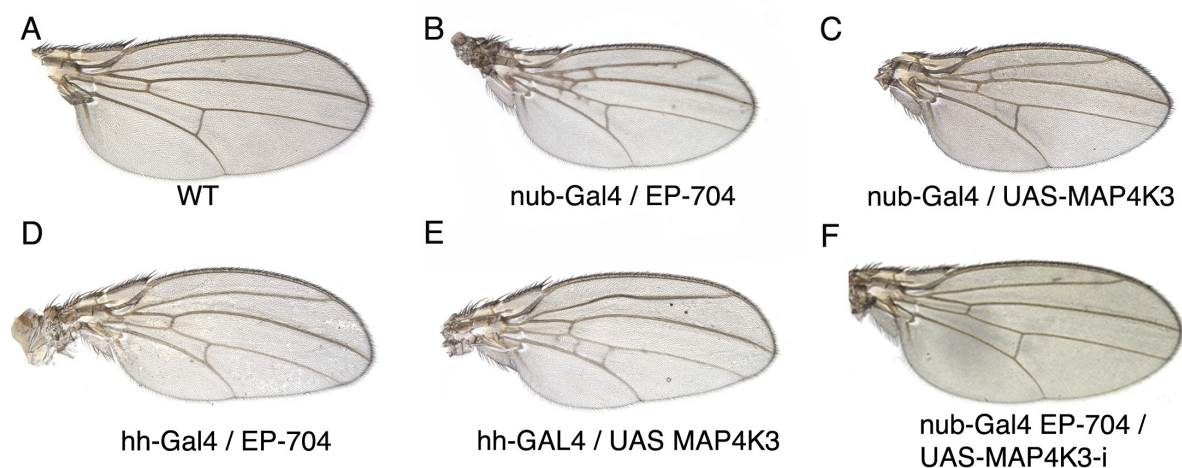


FIGURA R7: Comparación de los fenotipos observados en combinaciones de las líneas *EP-704* y *UAS-MAP4K3* con diferentes líneas *Gal4*

A) Ala silvestre. **B-E)** Las combinaciones *nub-Gal4/EP-704* (B) y *hh-Gal4/EP-704* (D) presentan el mismo fenotipo de reducción de tamaño del ala y extravenas que las combinaciones *nub-Gal4/UAS-MAP4K3* (C) y *hh-Gal4/UAS-MAP4K3* (E) respectivamente. **F)** El fenotipo de la combinación *nubGal4/EP-704* es suprimido cuando incluimos un ARN-i dirigido contra el gen *CG7097* (*nub-Gal4 EP704/UAS-MAP4K3-i*).

1.3.-Características moleculares de *CG7097*

La proteína codificada por el gen *CG7097* tiene dos isoformas, la isoforma A de 1218 aminoácidos y la isoforma B de 947 aminoácidos. Ambas isoformas contienen un dominio Ser/Thr quinasa en la región N-Terminal y un dominio CNH (Citron Homology Domain) en la región C-Terminal (Fig. R8B). Estas proteínas pertenecen al grupo de proteínas Sterile 20 quinasas de levaduras, que tiene diferentes homólogos en humanos, *D. melanogaster*, *C. elegans* y otros organismos (Fig. R8A). El grupo Ste20 quinasas se divide en 2 familias: p21-Activated Kinases (PAK) y Germinal Center Kinases (GCK). *CG7097* tiene homología con la subfamilia GCK-I (Germinal Center Kinase-I) (Dan et al., 2001). La subfamilia GCK-I, además de los ya citados dominios, tiene una región intermedia muy variable, con motivos ricos en prolinas (Fig. R8A). Las proteínas de la subfamilia GCK-I son también conocidas como MAP4K3 en diferentes organismos, nombre por el que nos referimos a partir de ahora a la proteína codificada por el gen *CG7097*.

Para estudiar la expresión y localización subcelular de la proteína MAP4K3, generamos un anticuerpo específico contra ella (ver Materiales y Métodos). Encontramos que MAP4K3, al igual que su ARNm, se expresa de manera generalizada en todos los discos imaginales, y que la proteína tiene una localización restringida al citoplasma de las células (Fig. R9A). Para confirmar la especificidad de este anticuerpo realizamos tinciones inmunohistoquímicas en discos imaginales de ala en los que o bien disminuimos (*en-Gal4/UAS-MAP4K3-i*) o aumentamos (*nub-Gal4/UAS-MAP4K3*) los niveles de MAP4K3. En ambos casos detectamos el cambio esperado en los niveles de expresión de esta proteína con nuestro anticuerpo (Fig. R9B-C). También encontramos en western-blots un aumento en los niveles de MAP4K3 en células S2 transfectadas con *UAS-MAP4K3* respecto a células sin transfectar (Fig. R9D).

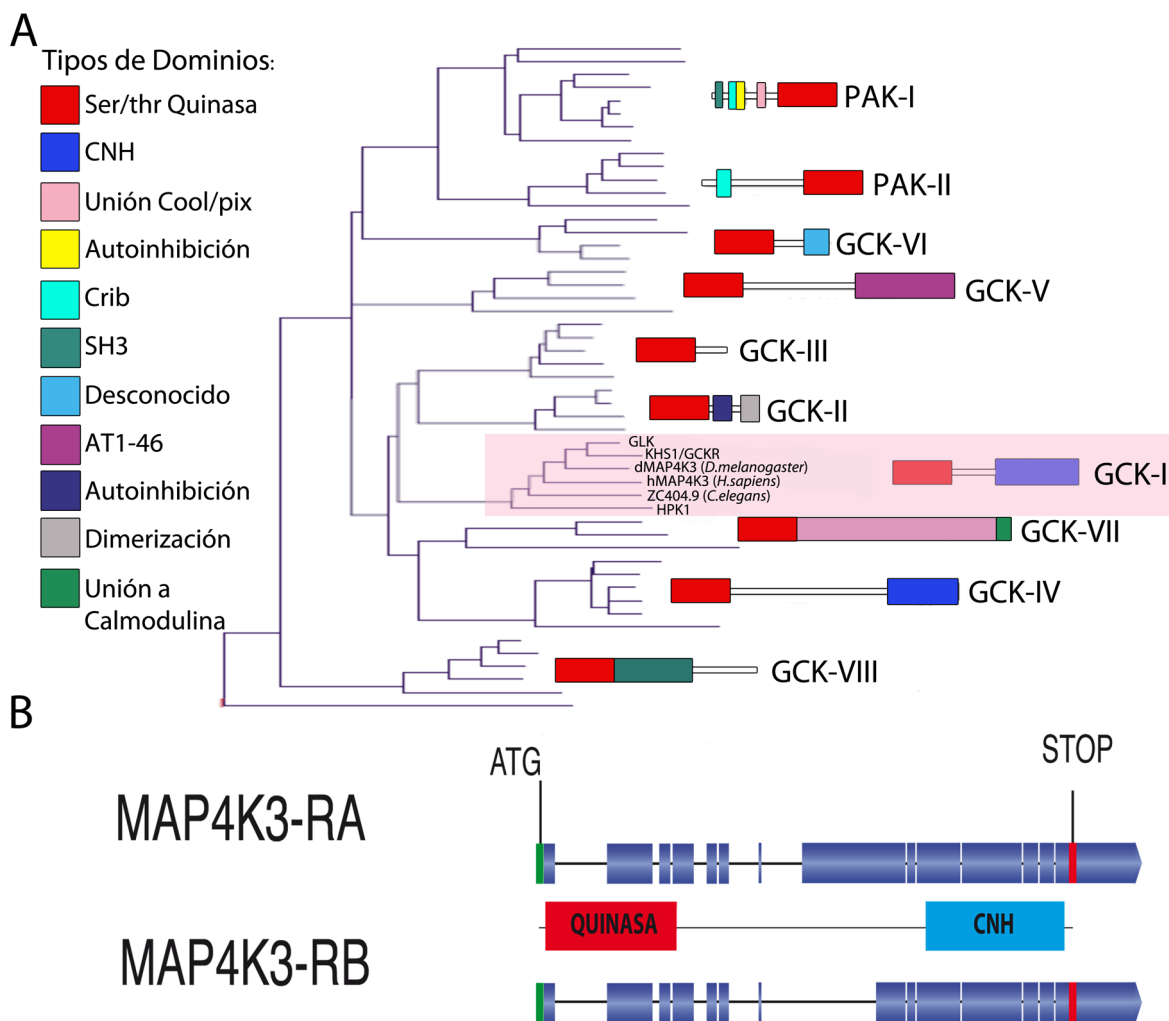


FIGURA R8: Super-familia de proteínas Sterile 30 quinasas

A) Grupo de proteínas Sterile 20 quinasas, que presentan miembros en humanos, *D. melanogaster*, *C. elegans* y otros organismos. El grupo Ste20 quinasas se divide en 2 familias: p21-Activated Kinases (PAK) y Germinal Center Kinases (GCK). MAP4K3 pertenece a la subfamilia GCK-I (Germinal Center Kinase-I), también conocida como MAP4K3. La subfamilia GCK-I, además de los ya citados dominios, tiene una región intermedia muy variable, con motivos ricos en prolina. **B)** MAP4K3 tiene dos isoformas, la isoforma A de 1218 aminoácidos y la isoforma B de 947 aminoácidos. Ambas isoformas contienen un dominio Ser/Thr quinasa (rectángulo rojo) en la región N-Terminal y un dominio CNH (Citron Homology Domain; rectángulo azul) en la región C-Terminal.

Como hemos mencionado antes, la proteína MAP4K3 tiene dos dominios; un dominio Ser/Thr quinasa en el extremo N-terminal y un dominio CNH en el extremo C-terminal (Fig. R8). Para identificar la participación de estos dominios en la función de MAP4K3 se realizaron construcciones UAS con el dominio CNH (que llamaremos *UAS-MAP4K3-ΔK*) y con el dominio quinasa (*UAS-MAP4K3-ΔCNH*). La sobre-expresión de la primera no causa ningún fenotipo (Fig. R10C, Gráfica R10G y Tabla R2), mientras que la sobre-expresión de *UAS-MAP4K3-ΔCNH* produce una fuerte reducción del tamaño del ala e induce muerte celular (Fig. R10D, Gráfica R10G y Tabla R2). Además, cuando sobre-expresamos la proteína MAP4K3 en el disco imaginal observamos que la proteína se detecta tanto en el núcleo como en el cito-

plasma (Fig. R9C). En el caso del dominio CNH encontramos que al ser sobre-expresado, su localización subcelular es mayormente nuclear (Fig. R10E-E’'). Por el contrario, la localización subcelular del dominio quinasa (*UAS-MAP4K3-ΔCNH*) en condiciones de sobre-expresión es mayoritariamente citoplasmática (Fig. R10F-F’'). En resumen, encontramos que MAP4K3 es una proteína citoplasmática cuya sobre-expresión, o la de su dominio quinasa, reduce tanto el tamaño como el número de células. Para entender las causas de la disminución del número de células, en el siguiente apartado estudiaremos la proliferación y muerte celular durante el desarrollo del disco de ala en condiciones de sobre-expresión de MAP4K3.

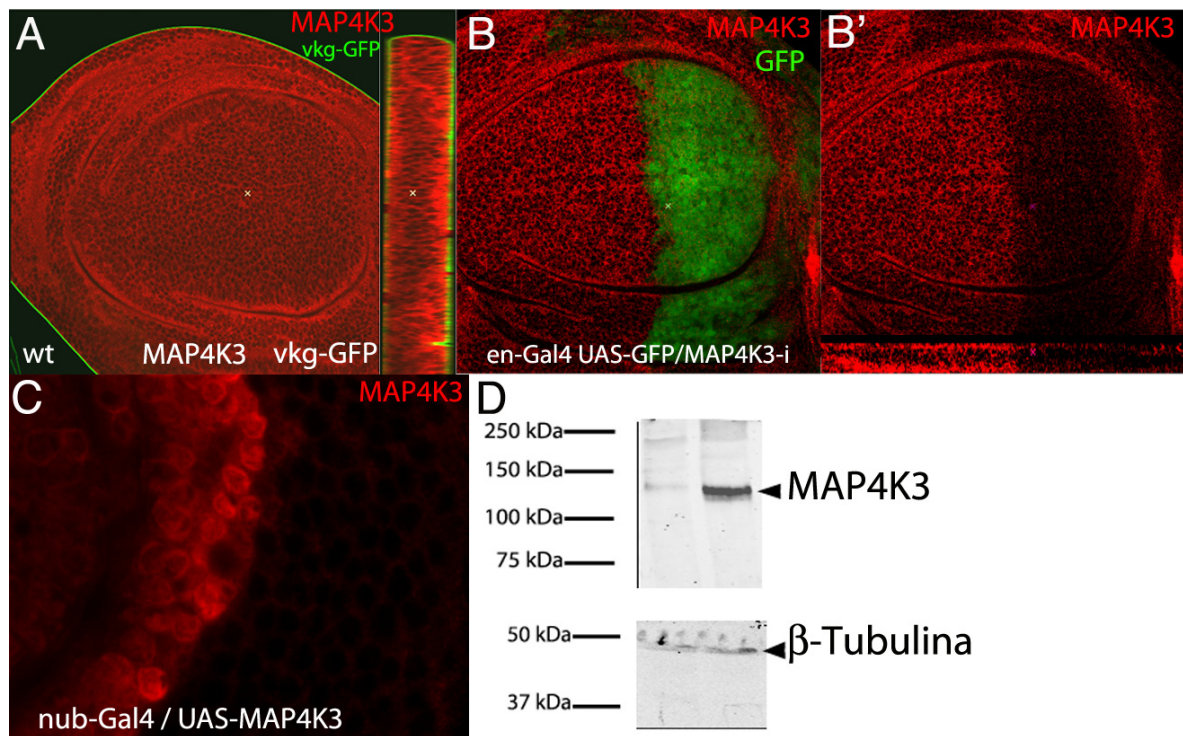


FIGURA R9: Expresión de la proteína MAP4K3 en el disco imaginal de ala

A) MAP4K3 (rojo) se localiza en el citoplasma de todas las células del disco imaginal de ala. En verde se marca la lámina basal del disco mediante la expresión de la proteína de fusión Viking-GFP (vkg-GFP). **B-B')** Expresión de MAP4K3 (rojo) en discos imaginales de ala de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP/UAS-MAP4K3-i*. La expresión de GFP se muestra en verde en B. **C)** Detalle de la región de ala mostrando la expresión de MAP4K3 (rojo) en discos de genotipo *nub-Gal4/UAS-MAP4K3*. **D)** Western blot mostrando el aumento en los niveles de MAP4K3 en células S2 transfectadas con UAS-MAP4K3 respecto a células sin transfectar. La expresión de β-Tubulina se ha usado como control de cantidad de proteína cargada.

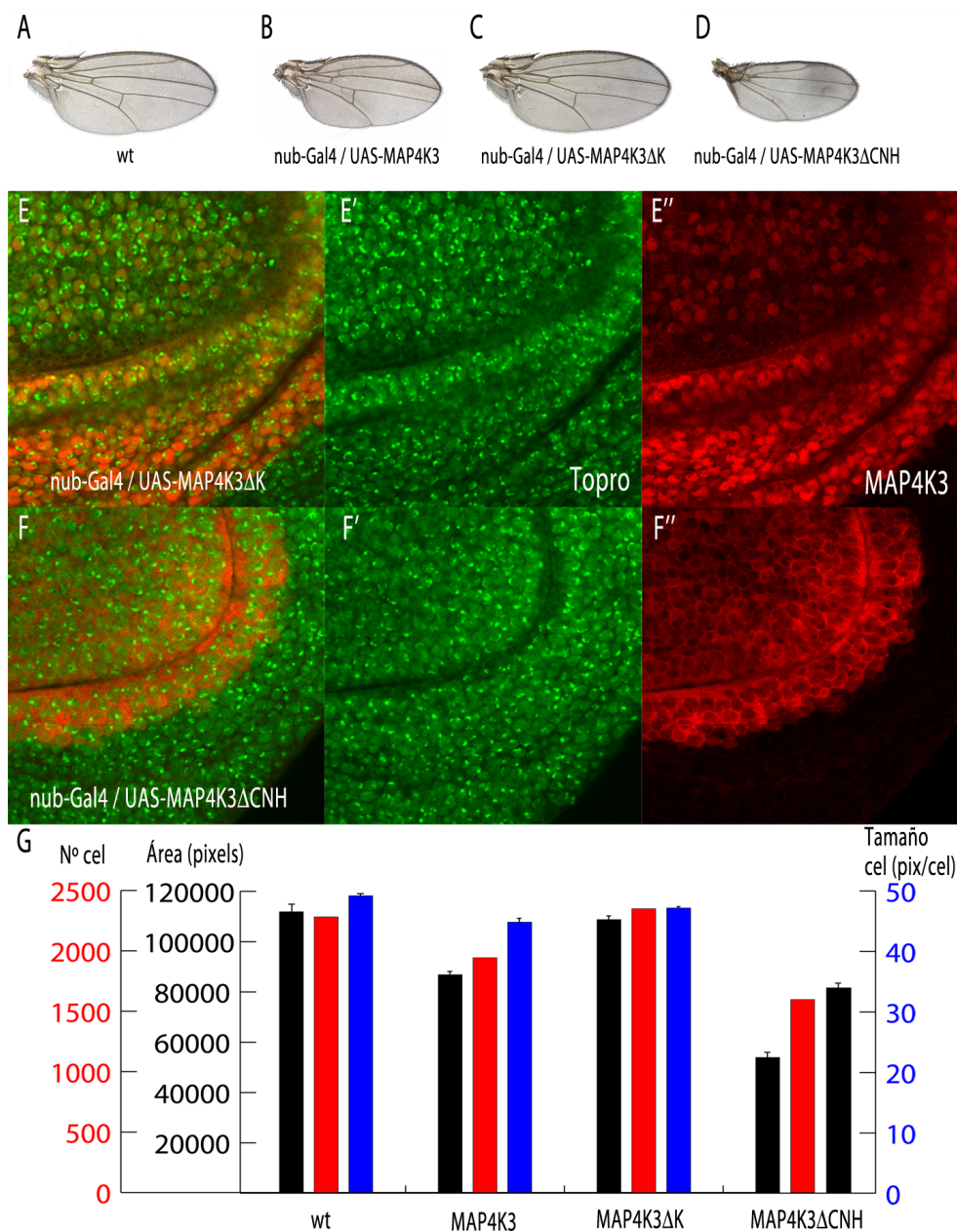


FIGURA R10: Fenotipos producidos por la expresión ectópica de los dominios amino y carboxi-terminal de MAP4K3 en el ala y localización de estas proteínas en el disco

A) Ala silvestre (wt). **B)** *nub-Gal4/UAS-MAP4K3*. **C)** *nub-Gal4/UAS-MAP4K3ΔK*. La expresión ectópica del dominio CNH no produce ningún fenotipo en el ala. **D)** *nub-Gal4/UAS-MAP4K3ΔCNH*. La expresión del dominio quinasa produce un fenotipo de reducción de tamaño del ala aún mayor que la expresión de la proteína completa. **E-E'')** La localización de MAP4K3ΔK (en rojo en E y E'') es mayoritariamente nuclear (Topro, en verde en E y E'). **F-F'')** La localización subcelular de MAP4K3ΔCNH es mayormente citoplasmática (Topro, en verde en F y F'). **G)** Representación gráfica de los valores numéricos del tamaño del ala (negro), número de células (rojo), y tamaño de células (azul) de los diferentes fenotipos mostrados en A-D.

	Área alas (píxeles)	t=	Número de células en región E dorsal	t=	n° Células total	Tamaño Células (pix/ cel)
nub/+	111869 (+/-2292)		66 (+/-2)		2282	49,02 (+/-2,1)
nub / MAP4K3	86840 (+/-2884)	7,9E-14	73 (+/-3)	6,4E-04	1944	44,67 (+/-2,3)
nub / MAP4K3ΔK	108772 (+/-2815)	0,015	68 (+/-2)	1,5E-05	2350	47 (+/-0,9)
nub / MAP4K3ΔCNH	53949 (+/-3102)	8,7E-10	96 (+/-7)	5,3E-06	1598	33,77 (+/-2,6)

TABLA R2: Valores numéricos del tamaño de ala, número de células y tamaño celular de los fenotipos producidos por la expresión ectópica de los dominios amino y carboxi-terminal de MAP4K3 en el ala.

1.4.-Descripción del desarrollo del fenotipo de sobre-expresión de MAP4K3.

La disminución del número de células del ala provocada por la sobre-expresión de MAP4K3 puede deberse a procesos de muerte celular y/o a la disminución en el ritmo de proliferación. Observamos que en discos de ala de tercer estadio larvario de genotipo *nub-Gal4/EP-704* y *ap-Gal4/UAS-MAP4K3* se produce una acumulación de células en apoptosis cerca de la membrana basal en la región de sobre-expresión (Fig. R11A y B).

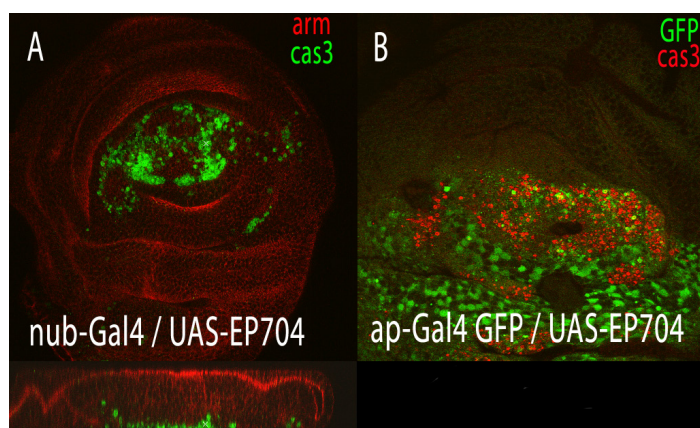


FIGURA R11: La expresión ectópica de MAP4K3 produce muerte celular autónoma en la región de sobre-expresión

A) Expresión de Cas3 activada en discos de genotipo *nub-Gal4/EP-704* (Cas3, en verde). En el panel inferior se muestra una sección transversal del mismo disco con la expresión de Armadillo (Arm, en rojo) y de Cas3 (en verde). Las células que expresan Cas3* se localizan en la región basal del epitelio. **B)** Expresión de Cas3 activada en discos de genotipo *ap-Gal4 UAS-GFP/EP-704*. En este caso la muerte celular (Cas3, en rojo) ocurre sólo en el compartimiento dorsal.

Para estudiar la proliferación en condiciones de sobre-expresión de MAP4K3, comparamos el índice mitótico en el compartimento posterior con respecto al anterior en discos de ala de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP/+* y *en-Gal4 UAS-GFP/UAS-MAP4K3*. Calculamos el índice mitótico como la media del cociente entre el número de células en mitosis de un compartimento (marcadas con anticuerpo anti-Histona3 fosforilada; PH3) y el área del mismo compartimento en una muestra de 15 discos (Fig. R12A-B). Encontramos un aumento significativo de

la proliferación en el compartimento posterior, ya que en discos *en-Gal4 UAS-GFP/UAS-MAP4K3* el índice mitótico (ratio posterior/anterior) es de 1,8 (sd. 0,26) (Fig. R12B) mientras que en discos *en-Gal4 UAS-GFP/+*; es de 1,4 (sd. 0,07) (Fig. R12A). Como la sobre-expresión de MAP4K3 induce muerte celular, como se muestra en la figura R11, pensamos que el aumento de la proliferación podría ser debido a la proliferación compensatoria que produce la apoptosis (Huh et al., 2004; Perez-Garijo et al., 2004). De hecho, el índice mitótico en discos donde a la vez que sobre-expresamos MAP4K3 inhibimos la apoptosis (*en-Gal4 UAS-GFP/UAS-MAP4K3; UAS-dIAP*) es cercano a niveles normales (1,27 sd 0,23; Fig. R12C), confirmando que el aumento de proliferación de los experimentos anteriores es una consecuencia de la inducción de la muerte celular.

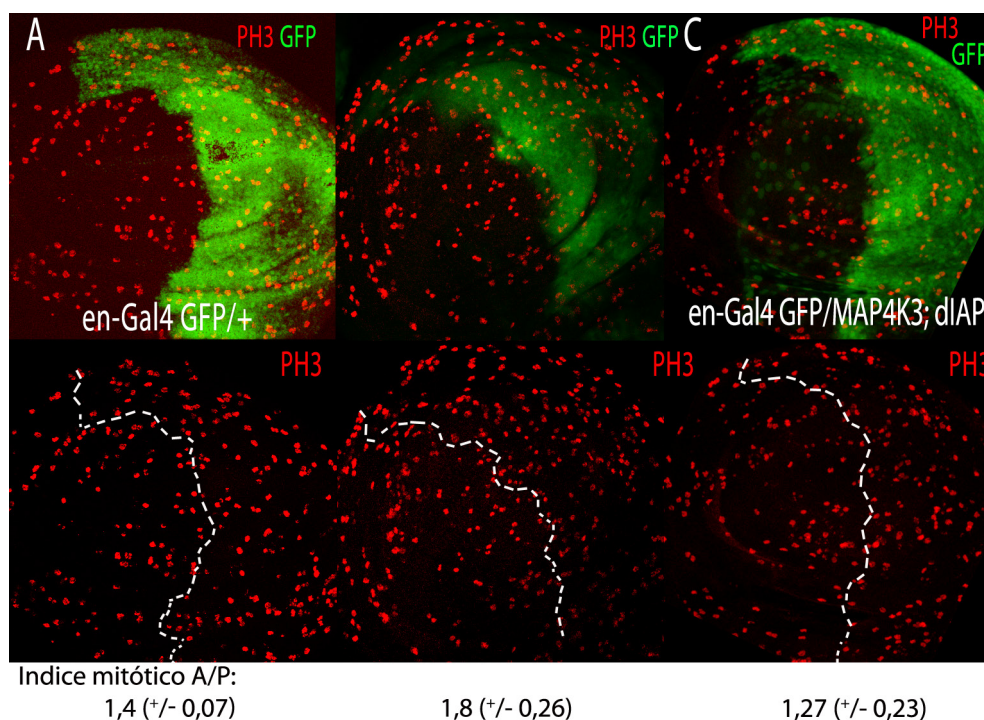


FIGURA R12: La expresión ectópica de MAP4K3 produce un aumento del número de células en mitosis

A-A') Expresión de PH3 (en rojo) en discos control (*en-Gal4 UAS-GFP/+*) de tercer estadio larvario. **B-B')** El número de células en mitosis en el compartimento posterior de discos *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-MAP4K3* aumenta, como también indica el índice mitótico (número debajo de B'). **C-C')** En discos *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-MAP4K3; UAS-dIAP*, donde suprimimos la muerte celular provocada por el exceso de MAP4K3, la expresión de PH3 es similar a la de los discos control. El compartimento posterior de todos los discos está marcado en verde con GFP. A', B' y C' muestran los canales rojos (PH3) de A, B y C, respectivamente.

Para estudiar si la sobre-expresión de MAP4K3 produce algún cambio en el ciclo celular de las células imaginales analizamos mediante la técnica de FACS (ver Materiales y Métodos) los discos *nub-Gal4 UAS-GFP/UAS-MAP4K3*, comparándolos con discos control *nub-Gal4 UAS-GFP/+*. En las medidas de porcentaje de células en las fases G1 y G2 del ciclo celular no encontramos ningún cambio entre los discos control y los discos con sobre-expresión de MAP4K3 (Fig. R13).

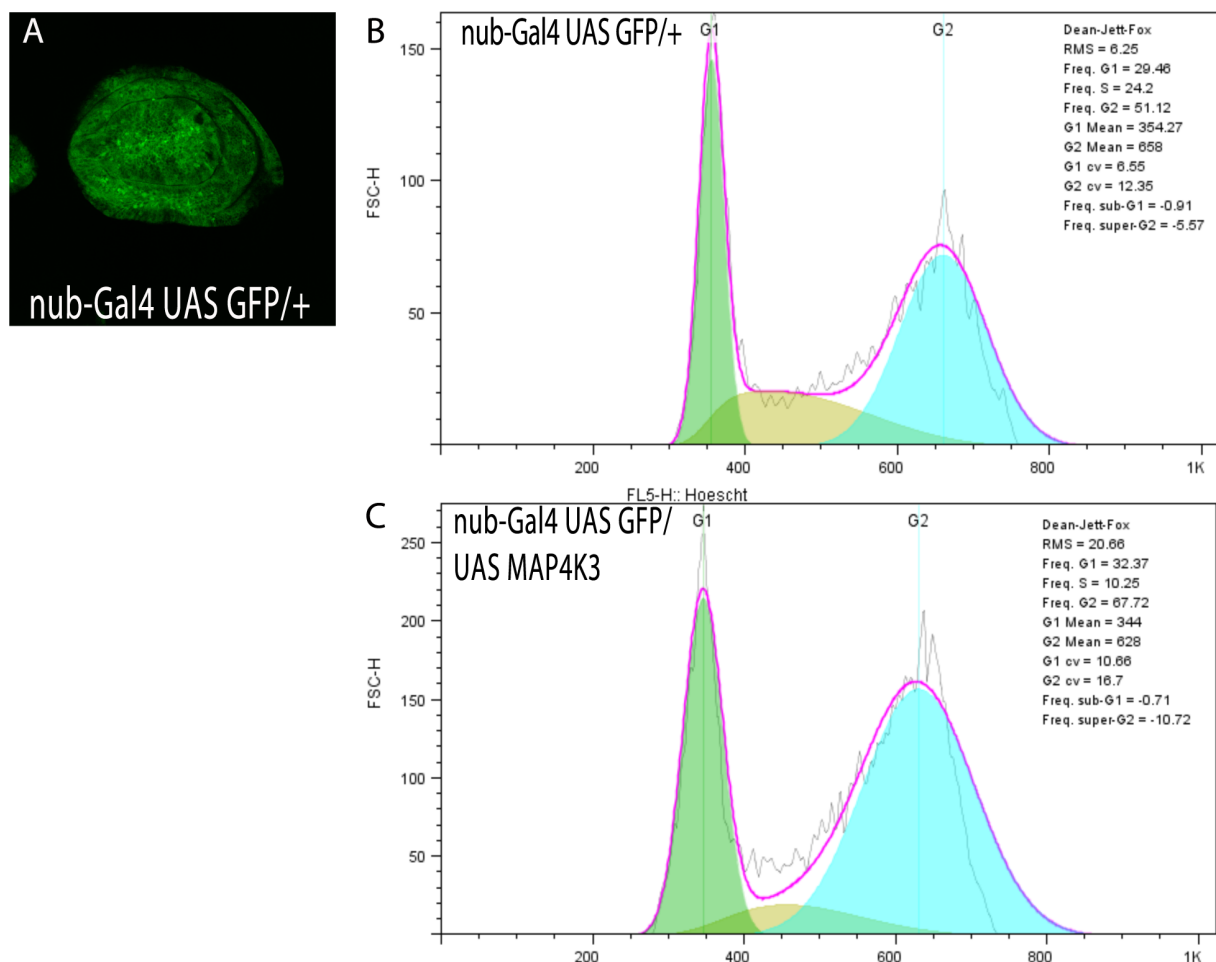


FIGURA R13: La expresión ectópica de MAP4K3 no produce cambios en el ciclo celular

A) Patrón de expresión de *nub-Gal4* en discos de genotipo *nub-Gal4 UAS-GFP/+*. Las células GFP+ fueron utilizadas para el análisis del ciclo celular. **B-C)** Perfiles del ciclo celular de discos control *nub-Gal4 UAS-GFP/+* (B) y discos *nub-Gal4 UAS-GFP/UAS-MAP4K3* (C). La fracción de células en las fases G1 y G2 es similar en ambos casos.

Para estudiar la contribución de la muerte celular al fenotipo de disminución de tamaño, analizamos alas y discos donde inhibimos la muerte celular en el fondo genético *nub-Gal4/UAS-MAP4K3*. Para ello, utilizamos diferentes inhibidores de la apoptosis que actúan a distintos niveles en la cascada apoptótica. De esta manera combinamos la condición *nub-Gal4/UAS-MAP4K3* con la deficiencia *Df(3R)H99*, que elimina los genes pro-apoptóticos *reaper*, *hid* y *grim*; con la sobre-expresión de dIAP, que reprime a la caspasa Dronc; con la sobre-expresión de Puckered (*puc*), que reprime a Basket en la ruta JNK; y con la expresión de P35, que es una proteína de baculovirus que inhibe a todas las caspasas efectoras (Fig. R14, Gráfica R14G y Tabla R3). En el caso de la utilización de la *Df(3R)H99* en heterocigosis, la reducción de la muerte celular no rescata el fenotipo de sobre-expresión provocado por MAP4K3 (Fig. 14C y Tabla R3). Cuando la muerte celular es inhibida mediante la expresión ectópica de *puc* o *dIAP*, no sólo no se rescata el tamaño de ala, sino que ésta se hace más pequeña, pasando de un 22% de reducción a un 47% y 37% respectivamente (Fig. 14D y E, Gráfica R14G Tabla R3). En el caso de *puc*, la reducción de tamaño es aún mayor, y aparecen células diferenciadas entre la superficie dorsal y la ventral del ala (Fig. 14D y Tabla R3). Finalmente,

rescatando la muerte celular con P35 las alas aparecen con engrosamiento de venas y plegadas impidiendo el cálculo de su tamaño (Fig. 14F y Tabla R3). Estudiando en detalle las características fenotípicas del rescate de la muerte celular con dIAP vemos que el número de células no se ve afectado y en cambio si se ve más reducido su tamaño (Fig. R14E, Gráfica R14G Tabla R3).

Estos resultados sugieren que la sobre-expresión de MAP4K3 tiene dos efectos independientes, uno relacionado con la inducción de apoptosis y otro afectando al crecimiento y división celular. Los fenotipos observados en el ala y los efectos descritos en el disco son similares por un lado a los causados por la vía InR/TOR (crecimiento) y por otro a la vía JNK (apoptosis), lo que sugiere que estas vías de señalización podrían estar afectadas por la MAP4K3.

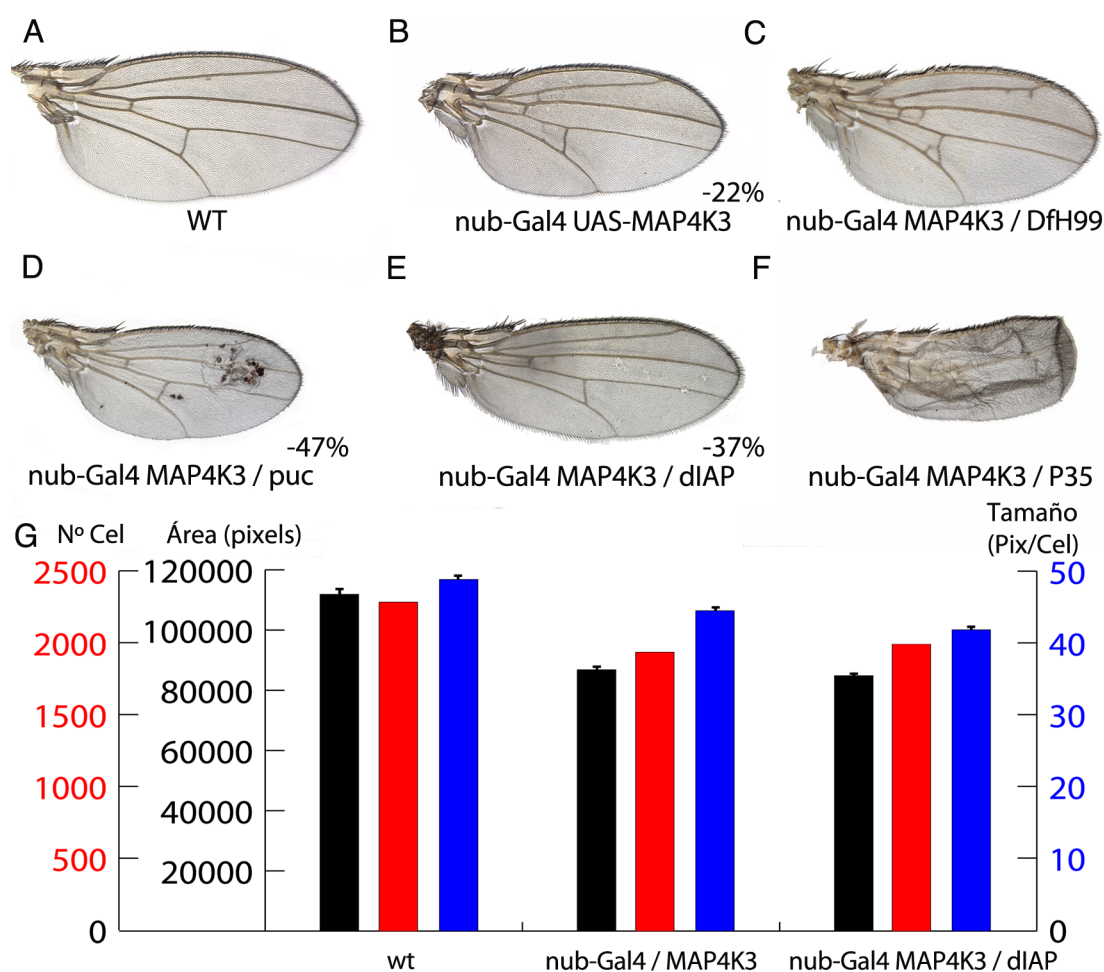


FIGURA R14: Efectos en el ala de la inhibición de la muerte celular provocada por la expresión ectópica de MAP4K3

A) Ala silvestre (wt). **B)** *nub-Gal4 / UAS-MAP4K3*. **C)** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3 / Df(3R)H99*. El rescate de la muerte celular (C) no rescata el fenotipo de sobre-expresión provocado por MAP4K3 (B). **D-E)** Cuando la muerte celular es inhibida mediante la expresión ectópica de *puc* (*nub-Gal4 UAS-MAP4K3 / UAS-puc* / +; D) o dIAP (*nub-Gal4 UAS-MAP4K3 / UAS-dIAP* / +; E) no sólo no se rescata el fenotipo de reducción del tamaño de ala, sino que las alas son aún menores en tamaño. **F)** En el caso de rescatar la muerte celular con P35 (*nub-Gal4 UAS-MAP4K3; UAS-P35* / +;), las alas aparecen con engrosamiento de venas y plegadas, impidiendo el cálculo de su tamaño. **G)** Representación gráfica del número de células (rojo), tamaño del ala (negro) y tamaño de células (azul) de las combinaciones mostradas en A, B y E.

	Área alas (píxeles)	t=	Número de células en región E dorsal	t=	n° Células total	Tamaño Células (pix/ cel)
nub/+	111869 (+/-2292)		66 (+/-2)		2282	49,02 (+/-2,1)
nub / MAP4K3	86840 (+/-2884)	7,97E-14	73 (+/-3)	6,48E-04	1944	44,67 (+/-2,3)
nub MAP4K3 / dIAP	85857 (+/-1005)	0,48	76 (+/-3)	7,01E-05	2008	42,76 (+/-2)
nub MAP4K3 / puc	59424 (+/-12451)	2,6E03				
nub MAP4K3 / DfH99	88026 (+/-4793)	0,512				

TABLA R3: Valores numéricos del tamaño de ala, número de células y tamaño celular de los efectos en el ala de la inhibición de la muerte celular provocada por la expresión ectópica de MAP4K3.

1.5.-Posible relación con JNK e InR/TOR

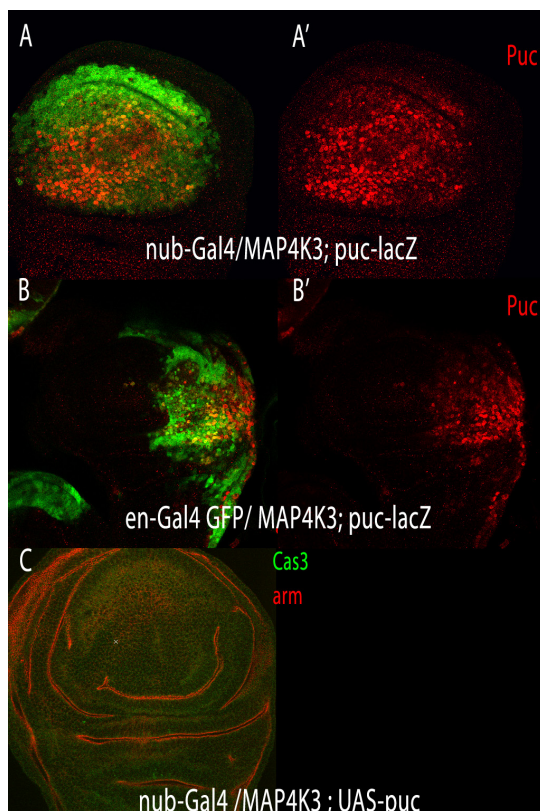


FIGURA R15: La expresión ectópica de MAP4K3 produce la activación de la ruta de señalización JNK

A-A') *nub-Gal4 UAS-GFP/UAS-MAP4K3; puc-LacZ/+*. **B-B')** *en-Gal4 UAS-GFP/UAS-MAP4K3; puc-LacZ/+*. **C)** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3/ UAS-puc*. La expresión ectópica (GFP, en verde en A y B) de MAP4K3 induce la expresión de *puc-lacZ* (rojo en A-A' y B-B'), gen diana de la ruta JNK; y lo hace de manera autónoma a la región de sobre-expresión. **C)** La muerte celular provocada por la expresión ectópica de MAP4K3 es debido a un aumento de la actividad de la ruta JNK, ya que cuando inhibimos su señalización (*nub-Gal4 /UAS-MAP4K3; UAS-puc*) no existe muerte celular (Cas3 en verde).

La expresión ectópica del gen *CG7097* produce una acumulación de células cerca de la membrana basal del disco de ala que expresan Cas3 activada de manera autónoma. Esta muerte celular es producida por un aumento en la actividad de la ruta JNK, ya que en discos de genotipo *nub-Gal4/UAS-MAP4K3; puc-lacZ/+* y *en-Gal4 UAS-GFP/UAS-MAP4K3; puc-lacZ/+* vemos cómo se induce la expresión de *puc*, un reportero de la actividad de la ruta JNK (Fig. R15A y B). Asimismo, vemos cómo discos de genotipo *nub-gal4 UAS-MAP4K3; UAS-puc* ven reducidos los niveles de Cas3 activada (Fig. R15C), indicando que la sobre-expresión del gen *CG7097* activa la vía JNK y que esta activación es suprimida por la presencia de altos niveles de Puc.

El defecto en crecimiento que produce la sobre-expresión de MAP4K3 podría ser debido a una reducción de la actividad tanto de la ruta InR como TOR, ya que la disminución en la actividad de estas rutas produce efectos en el tamaño de los órganos sin afectar a su patrón. Para discernir si la expresión ectópica de MAP4K3 causa una disminución de la ruta de la Insulina, que principalmente es la responsable de transmitir la señal sistémica del control de crecimiento, o a una disminución de la actividad de la ruta TOR, responsable de detectar los niveles de aminoácidos disponibles, estudiamos el desarrollo del cuerpo graso. Este órgano, que es el equivalente al hígado en mamíferos, es responsable entre otras funciones de acumular vesículas de grasa que cambian de tamaño según la disponibilidad de proteínas en la dieta (Bradley y Leever, 2003; Colombani et al., 2003; Rusten et al., 2004; Zinke et al., 1999). Así, cuando a una larva le restringimos proteínas en la dieta o presenta una reducción de la actividad de TOR, estas vesículas lipídicas se agregan y aumentan de tamaño (Fig. R16B). En cambio, cuando disminuimos la actividad de la ruta InR estas vesículas no se ven afectadas (Fig. R16C). Al expresar de manera ectópica MAP4K3 en el cuerpo graso con *ppl-gal4 (pumples)* observamos un fenotipo de acumulación de vesículas (Fig. R16D), indicando que esta proteína podría estar implicada en la señalización de la ruta TOR.

Como resumen, nuestros resultados indican que MAP4K3 en condiciones de sobre-expresión activa la vía JNK y reprime la vía TOR de manera independiente.

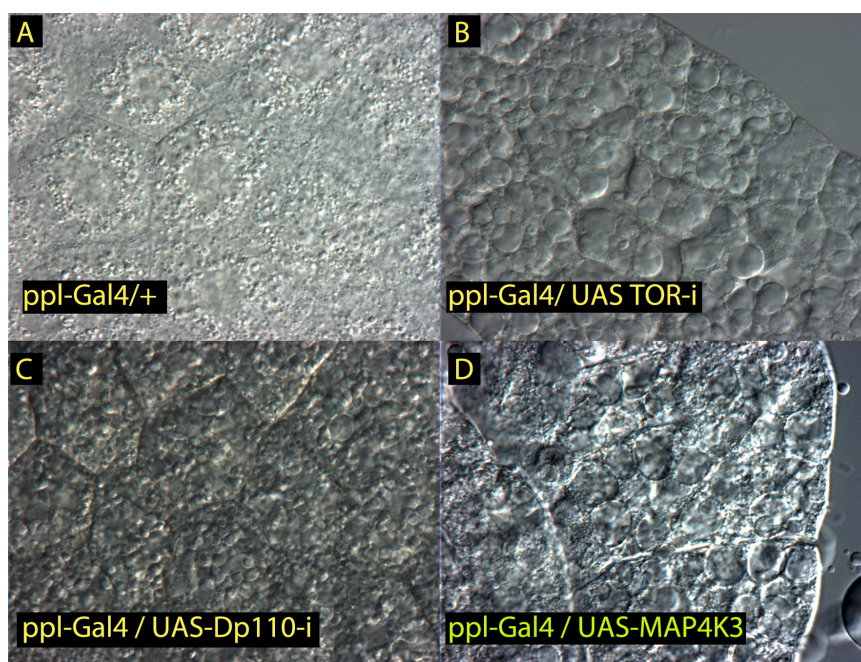


FIGURA R16: La fusión de la vesículas lipídicas es un fenotipo específico de la inhibición de la ruta TOR

A) Cuerpo graso silvestre (*ppl-Gal4/+*). **B)** Cuerpo graso de genotipo *ppl-Gal4/UAS-TOR-i*. El descenso de la señalización de TOR produce la fusión de vesículas lipídicas. **C)** Cuerpo graso de genotipo *ppl-Gal4/UAS-Dp110-i*. La reducción de la señalización de la vía de la insulina no produce ningún fenotipo de fusión de vesículas. **D)** Cuerpo graso de genotipo *ppl-Gal4/UAS-MAP4K3*. La sobre-expresión de MAP4K3 produce el mismo fenotipo de fusión de vesículas que la reducción de la actividad de TOR.

2.- RELACIÓN FENOTÍPICA DE MAP4K3 CON LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN TOR Y JNK.

Para comparar los fenotipos observados tras incrementar los niveles de MAP4K3 con aquellos típicos de alteraciones en los niveles de señalización de las rutas TOR y JNK, realizamos combinaciones entre líneas UAS de diferentes componentes de estas rutas y la línea *nub-Gal4*. Con estas comparaciones esperamos determinar si MAP4K3 es un buen candidato para afectar la actividad de estas vías de señalización.

2.1.-Fenotipos por manipulación de la vía InR/TOR

La vía de señalización InR/TOR está activa en todas las células del organismo y tiene un papel fundamental durante el crecimiento de los órganos, afectando tanto al número como al tamaño de las células. Para evaluar directamente las consecuencias del aumento o disminución de la actividad de esta ruta, expresamos en el ala construcciones ARN de interferencia (ARNi) y versiones modificadas (versiones activadas o dominantes negativas) de miembros de la ruta. En todos los casos encontramos cambios en el tamaño del ala consistentes con el requerimiento descrito de esta ruta en el desarrollo normal del disco imaginal (Goberdhan y Wilson, 2003; Montagne et al., 1999; Oldham et al., 2000). De esta manera, si aumentamos la actividad de la ruta InR/TOR observamos un aumento del tamaño de las alas adultas, generalmente provocado tanto por el aumento del número como del tamaño de las células (Gráfica R17J y Tabla R4). Para aumentar la actividad de la ruta sobre-expresamos versiones activadas de *Akt* (Fig. R17B), *RagA* (Fig. R17C) y *dS6K* (Fig. R17D), reducimos los niveles de expresión de los moduladores negativos *Pten* (Fig. R17E), *TSC1* (Fig. R17F), *TSC2* (Fig. R17G), y *4BPE1* (Fig. R17H), y utilizamos un dominante negativo de RagC (*RagC^{DN}*) (Fig. R17I). Los aumentos en el tamaño del ala fueron desde el 3-5% (expresión ectópica de *dS6K* activado y *RagC^{DN}* y reducción de *4BPE1*; Fig. R17D, R17I, R17H, respectivamente) hasta al 32% (reducción de la expresión de *Pten*; Fig. R17E). Las células aumentan de tamaño un 13-16% cuando se reducen los niveles de *TSC1* y *TSC2* (Fig. R17F, R17G), y en un único caso disminuyen de tamaño un 8% cuando se sobre-expresa *RagC^{DN}* (Fig. 17I). El número total estimado de células en estas combinaciones es mayor del normal. De esta manera, la expresión ectópica de *RagA* activado y la reducción de la expresión de *Pten* producen un 20% más de células (Fig. R17C, R17E), mientras que la sobre-expresión de *dS6K* activado y la reducción de los niveles de *4BPE1* producen una disminución de más del 5% (Fig. R17D, R17I). Como se puede observar, existe una gran variación tanto del tamaño de las células como del número de células según el componente de la ruta de señalización que es afectado (Tabla R4). Esto es debido, probablemente, a su función en la ruta de señalización y a la distinta eficiencia de cada construcción UAS utilizada. Los resultados numéricos de todas las combinaciones analizadas se encuentran en la Tabla R4 y representados gráficamente en la gráfica de la figura R17J.

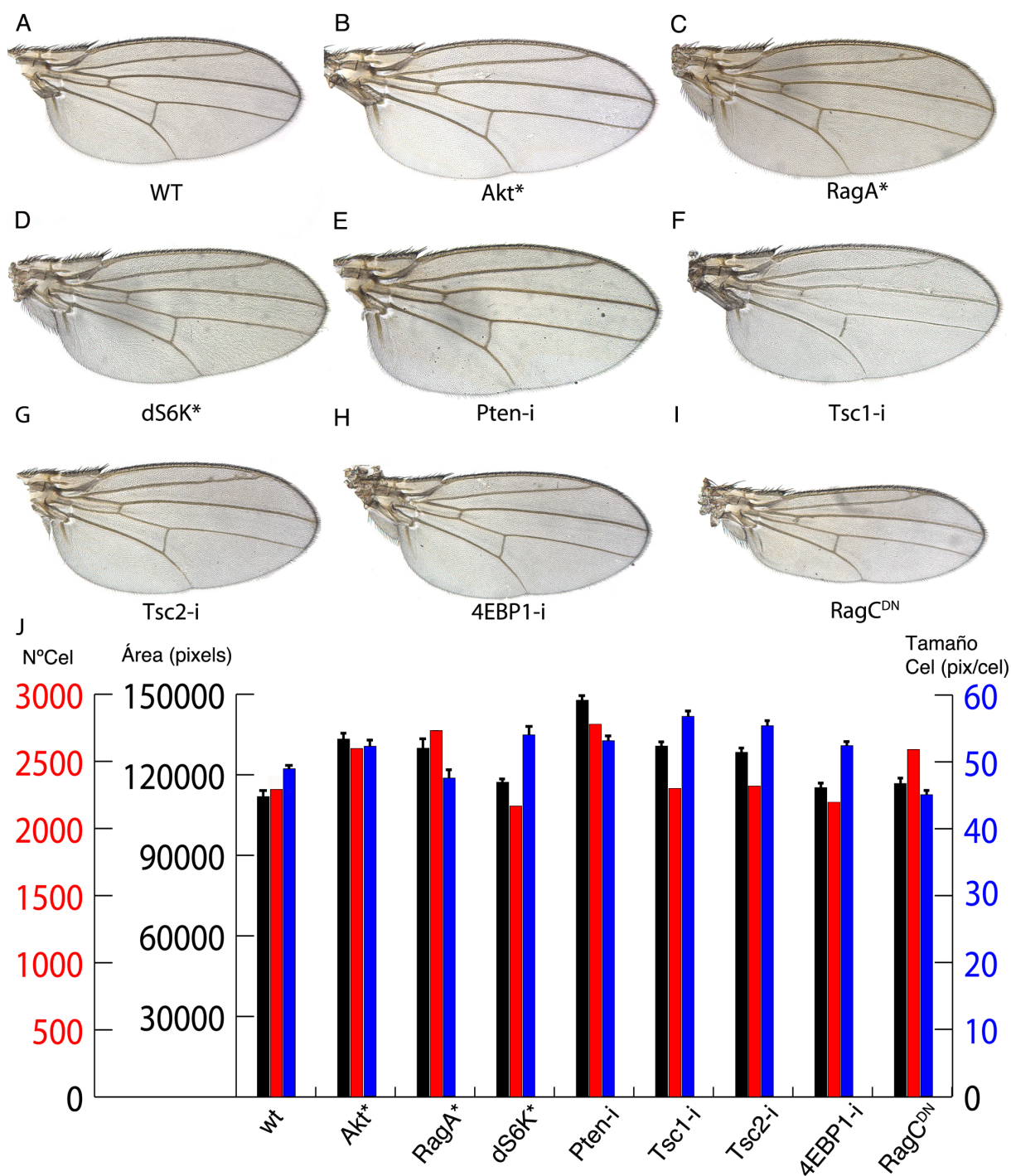


FIGURA R17: Fenotipos producidos en el ala por el aumento de la actividad de las rutas InR/TOR

A-I) Alas de combinaciones de la línea *nub-Gal4* con líneas UAS en las que se expresan diferentes formas activadas (Akt, B; RagA, C y dS6K, D), ARNi (Pten, E; Tsc1, F; Tsc2, G y 4EBP1, H) y dominantes negativos (RagC, I). En cada imagen está anotado el elemento de la ruta que ha sido manipulado. **J)** Representación gráfica de los valores numéricos del tamaño del ala (negro), número de células (rojo), y tamaño de células (azul) de los diferentes fenotipos. La activación de las rutas de la InR/TOR en el ala produce un aumento del tamaño de las alas adultas, generalmente provocado tanto por el aumento del número como del tamaño de las células.

	Área alas (píxeles)	t=	Número de células en región E dorsal	t=	nº Células total	Tamaño Células (pix/cel)
nub/+	111869 (+/- 2292)		66 (+/-2)		2282	49,02 (+/-2,1)
Akt*	133298 (+/- 5300)	8,56E-07	62 (+/-3)	2,33E-05	2597	52,33 (+/-2,2)
RagA*	129914 (+/- 6264)	1,39E-10	68 (+/-3)	6,7E-02	2730	47,58 (+/-0,9)
dS6K*	117226 (+/-3740)	1,94E04	60 (+/-3)	1,83E-03	2168	54,08 (+/-2,7)
Pten-i	147783 (+/- 4400)	3,52E-09	61 (+/-2)	2,39E-05	2778	53,19 (+/-3,4)
Tsc1-i	130709 (+/- 4441)	1,82E-13	57 (+/-4)	1,46E-03	2300	56,82 (+/-2,3)
Tsc2-i	128382 (+/-1927)	8E-15	59 (+/-3)	2,46E-05	2317	55,4 (+/-2,4)
4EBP1-i	115227 (+/-4852)	6,28E-12	62 (+/-3)	3,91E-03	2198	52,42 (+/-2,2)
RagC ^{DN}	116735 (+/-4283)	2,21E-06	72 (+/-3)	3,66E-04	2590	45,08 (+/-2,6)

TABLA R4: Valores numéricos del tamaño de ala, número de células y tamaño celular de los fenotipos producidos en el ala por el aumento de la actividad de las rutas InR/TOR.

De manera opuesta a lo observado en el caso de activación de la ruta, la reducción de su actividad produce una disminución del tamaño del ala, provocada por la disminución del número y del tamaño de las células (Gráfica R18R y Tabla R5). Estos fenotipos son causados por la expresión de los ARNi de *Dp110* (Fig. R18B), *Pdk1* (Fig. R18C), *Akt* (Fig. R18D), *slimfast* (Fig. R18E), *path* (Fig. R18F), *CG1139* (Fig. R18G), *TOR* (Fig. R18H), *Raptor* (Fig. R23I), *Rictor* (Fig. R18J) o *dS6K* (Fig. R18K), así como por la sobre-expresión de versiones dominantes negativas de *Dp110* (Fig. R18L), *RagA* (Fig. R18M), *TOR* (*TOR^{TED}*; Fig. R18N), *dS6K* (Fig. R18Ñ), la versión activada de *RagC* (Fig. R18O) o las versiones normales de *TOR* (Fig. R18P) y *RagA* (Fig. R18Q). La reducción del tamaño del ala varía entre un 55 %, cuando se expresa ectópicamente *TOR^{Ted}* (Fig. R18N), a un 9 % cuando se reducen los niveles de *dS6K* (Fig. R18K). La reducción del número de células varía entre un 32% cuando se sobre-expresa *TOR^{TED}* (Fig. R18N) a un 2-5% cuando se sobre-expresa tanto la versión normal como la forma dominante negativa de *RagA* y el ARNi de *TOR* (Fig. R18M, R18H). Finalmente, la reducción del tamaño celular se sitúa en un rango de un 33-39% cuando se expresa ectópicamente *TOR^{TED}* o se reducen los niveles de expresión de *Raptor* (Fig. R18N, R18I), a un 2-6% cuando se sobre-expresa la versión normal de *RagA*, la versión activada de *RagC* o se reducen los niveles de expresión de *dS6K* (Fig. R18Q, R18O, R18K). Los resultados numéricos de todas las combinaciones analizadas se encuentran en la Tabla R5 y representados gráficamente en la gráfica de la figura R18R.

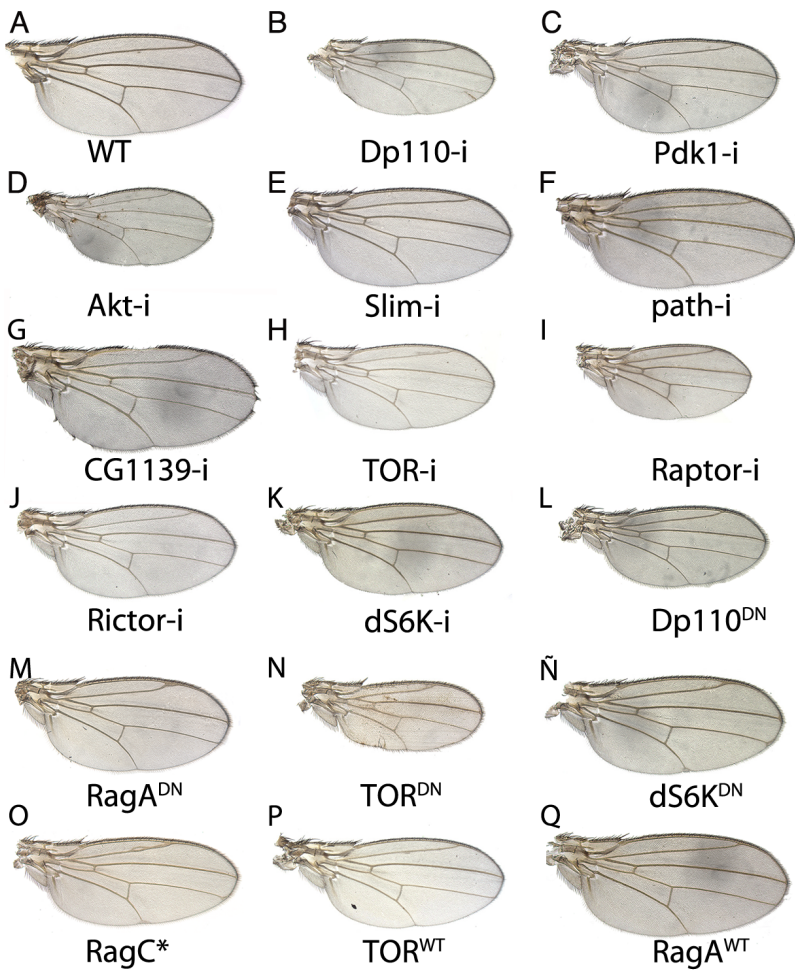
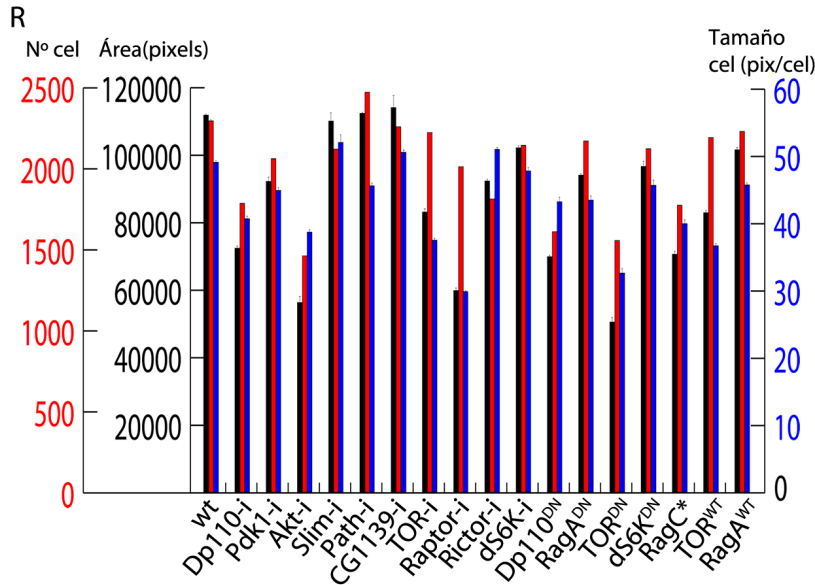


FIGURA R18: Fenotipos producidos en el ala por la disminución de la actividad de las rutas InR/TOR

A-Q) Alas de combinaciones de la línea *nub-Gal4* con líneas UAS en las que se expresan diferentes ARNi (Dp110, B; Pdk1, C; Akt, D; Slim, E; path, F; CG1139, G; TOR, H; Raptor, I; Rictor, J; dS6K, K), formas dominantes negativos (Dp110, L; RagA, M; TOR, N; dS6K, Ñ), formas activadas (RagC, O) y versiones normales (TOR, P; RagA, Q) de componentes de la ruta InR/TOR que causan una disminución del tamaño del ala. En cada imagen está anotado el elemento de la ruta que ha sido afectado. **R)** Representación gráfica de los valores numéricos del tamaño del ala (negro), número de células (rojo), y tamaño de células (azul) de los diferentes fenotipos mostrados en A-Q. La reducción en la actividad de las rutas de la InR/TOR en el ala produce una disminución del tamaño de las alas adultas, generalmente provocada tanto por el descenso del número como del tamaño de las células.



	Área alas (píxeles)	t=	Número de células en región E dorsal	t=	n° Células total	Tamaño Células (pix/cel)
nub/+	111869 (+/-2292)		66 (+/-2)		2282	49,02 (+/-2,1)
Dp110-i	72446 (+/-3637)	5,57E-08	80 (+/-3)	1,77E-08	1783	40,63 (+/-2,1)
Pdk1-i	92242 (+/-3166)	5,12E-06	73 (+/-3)	7,26E-05	2058	44,83 (+/-2,3)
Akt-i	56360 (+/-3220)	6,86E-07	84 (+/-2)	2,58E-09	1459	38,63 (+/-1,9)
Slim-i	110106 (+/-3008)	9,15E-12	63 (+/-2)	4,50E-09	2119	51,96 (+/-1,2)
Path-i	112409 (+/-4213)	2,35E-10	71 (+/-2)	1,51E-09	2470	45,52 (+/-2,4)
CG1139-i	114097 (+/-8154)	3,41E-04	64 (+/-4)	5,92E-07	2257	50,54 (+/-2,5)
TOR-i	83154 (+/-4037)	1,10E-09	87 (+/-5)	3,76E-05	2221	37,44 (+/-2,7)
Raptor-i	59900 (+/-4390)	5,51E-08	109 (+/-6)	0,67	2010	29,79 (+/-3)
Rictor-i	92328 (+/-4806)	1,95E-17	64 (+/-2)	7,77E-06	1810	51,02 (+/-2,9)
dS6K-i	102167 (+/-3134)	2,72E-08	68 (+/-4)	2,01E-04	2141	47,72 (+/-3,2)
Dp110 ^{DN}	69430 (+/-1880)	3,69E-09	75 (+/-2)	4,47E-07	1609	43,14 (+/-2,3)
RagA ^{DN}	94070 (+/-1597)	1,07E-11	75 (+/-3)	1,21E-05	2168	43,39 (+/-1,1)
TOR ^{DN}	50557 (+/-2265)	1,58E-08	100 (+/-10)	4,28E-07	1553	32,55 (+/-3,2)
dS6K ^{DN}	96679 (+/-2824)	3,29E-04	71 (+/-2)	1,068E-04	2120	45,6 (+/-1,9)
RagC*	97129 (+/-4271)	2,31E-11	71 (+/-4)	4,35E-05	2125	45,7 (+/-2,8)
TOR ^{WT}	82954 (+/-2738)	3,39E-04	86 (+/-3)	5,23E-05	2195	37,8 (+/-3)
RagA ^{WT}	101593 (+/-1647)	1,31E-04	71 (+/-2)	0,82	2226	45,65 (+/-2,8)

TABLA R5: Valores numéricos del tamaño de ala, número de células y tamaño celular de los fenotipos producidos en el ala por la disminución de la actividad de las rutas InR/TOR.

Finalmente, estudiamos la posibilidad de inducción de muerte celular tras la reducción en la actividad de la vía InR/TOR, y en dos combinaciones analizadas (*nub-Gal4/UAS-TOR^{ED}* y *nub-Gal4/UAS-Dp110-i*) no encontramos ninguna evidencia de la aparición de células apoptóticas (Fig. R19).

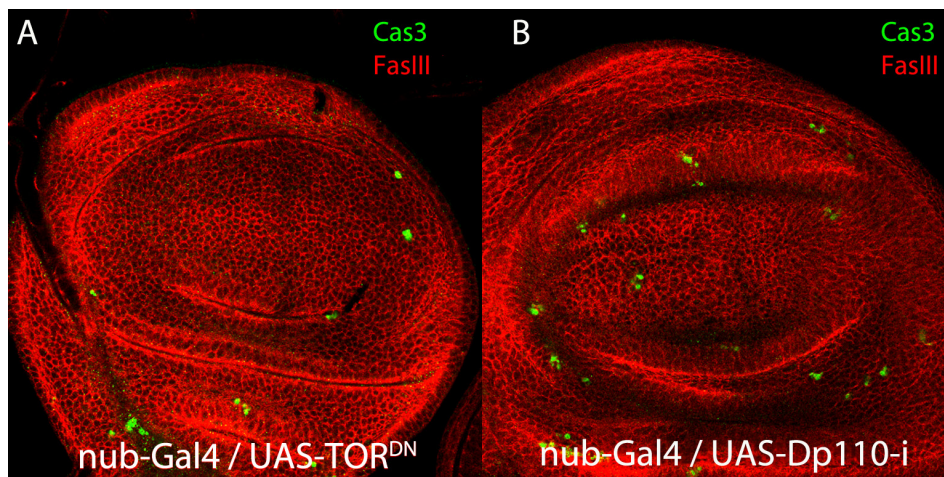


FIGURA R19: La reducción de la actividad de las rutas InR y TOR no produce muerte celular en el disco de ala

A-B) Tanto la reducción de la actividad de la ruta TOR (*nub-Gal4/UAS-TOR^{DN}*, A) como de la ruta InR (*nub-Gal4/UAS-Dp110-i*, B) en el disco imaginal de ala de tercer estadio larvario no producen un aumento de la apoptosis (Cas3, verde). El contorno de la célula está marcado con FasIII (rojo).

En resumen, los efectos fenotípicos causados por la sobre-expresión de MAP4K3, reducción del tamaño del ala, disminución del número y tamaño de células, son similares a los observados cuando se reduce la actividad de la ruta InR/TOR. Además, en ambos casos se ve reducido tanto el número como el tamaño de las células del ala. Es de destacar, sin embargo, que la modificación en la actividad de esta ruta no provoca muerte celular, como es el caso de la sobre-expresión de MAP4K3.

2.2) Fenotipos de manipulación JNK

La vía de señalización JNK está activa en momentos precisos del desarrollo en diferentes órganos de *Drosophila melanogaster* (Boutros et al., 2002; Boutros et al., 1998; Delaney et al., 2006; Galko y Krasnow, 2004; Manjon et al., 2007; Rusconi et al., 2000; Zeitlinger y Bohmann, 1999). En el ala, tiene un papel fundamental durante la evaginación del disco imaginal, activándose en la membrana peripodial durante la metamorfosis (Pastor-Pareja et al., 2004). Esta ruta también está encargada de eliminar mediante apoptosis a las células que han sido dañadas al sufrir diferentes formas de estrés tales como radiaciones ionizantes, daños mecánicos en el tejido o temperaturas extremas (Arya y Lakhotia, 2008; Arya et al., 2007; Inoue et al., 2001; Perez-Garijo et al., 2004).

Como en el caso anterior, para evaluar directamente las consecuencias de variar la actividad de esta ruta, expresamos en el ala construcciones ARNis, versiones modificadas (versiones activadas o dominantes negativas), y versiones normales de miembros de la ruta. De esta manera, si aumentamos la actividad de la ruta JNK inducimos muerte celular que lleva a un descenso del número de células del ala, produciendo una disminución de su tamaño, y además, en casos más extremos se produce la pérdida de algunos elementos del patrón. Dependiendo del gen afectado y del dominio en que se exprese se afecta la forma y tamaño del ala, debido a diferentes grados en la eliminación de células (Fig. R20). Para aumentar la actividad de la ruta sobre-expresamos versiones activadas de Hep (hep*; Fig. 20B), Bsk (Bsk^{AY}; Fig. 20C), y versiones normales del ligando Eiger (Fig. 20D) y dTraf1 (Fig. 20E).

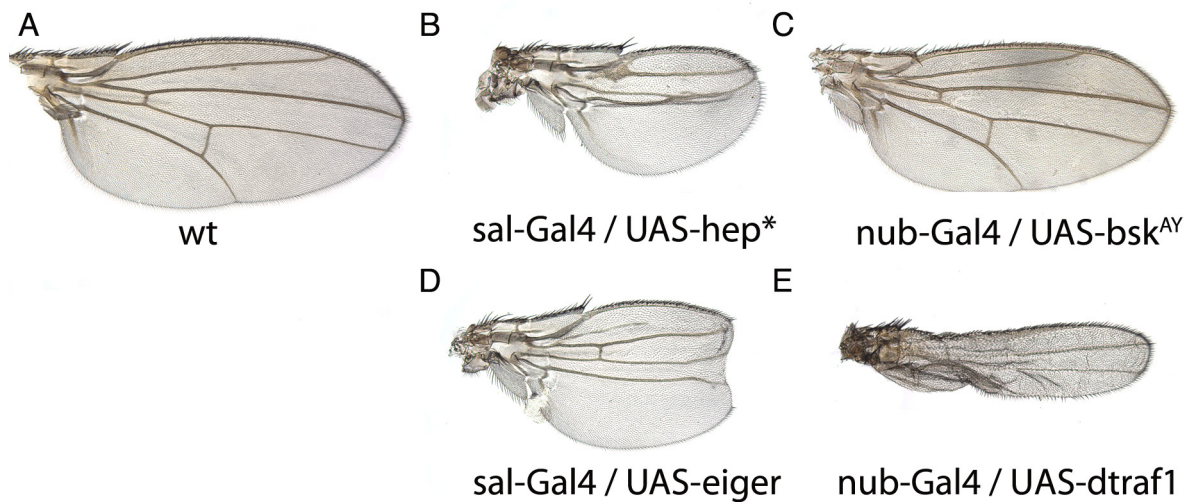


FIGURA R20: Fenotipos causados en el ala por un aumento de actividad de la ruta JNK

A) Ala control (wt). **B-E)** Alas de las combinaciones *sal^{EPx}-Gal4/UAS-hep** (B), *nub-Gal4/UAS-bsk^{AY}* (C), *sal^{EPx}-Gal4/UAS-eiger* (D) y *nub-Gal4/UAS-dtraf1*. La reducción del tamaño del ala depende del gen y del dominio de sobre-expresión y del dominio en que se expresa. El patrón del ala también se ve afectado, debido a diferentes grados en la eliminación de células.

Cuando reducimos la actividad de la ruta JNK, mediante la expresión de los ARNis de *wengen* (Fig. R21B), *dTraf1* (Fig. R21C), *mekk1* (Fig. R21D), *mekk4* (Fig. R21E), *hep* (Fig. R21F), así como por la expresión ectópica de la versión dominante negativa de Bsk (Fig. R21G) y la versión normal del inhibidor de la ruta Puc (Fig. R21H), no se produce ningún efecto, confirmando que esta ruta no tiene ninguna función durante el desarrollo normal del ala.

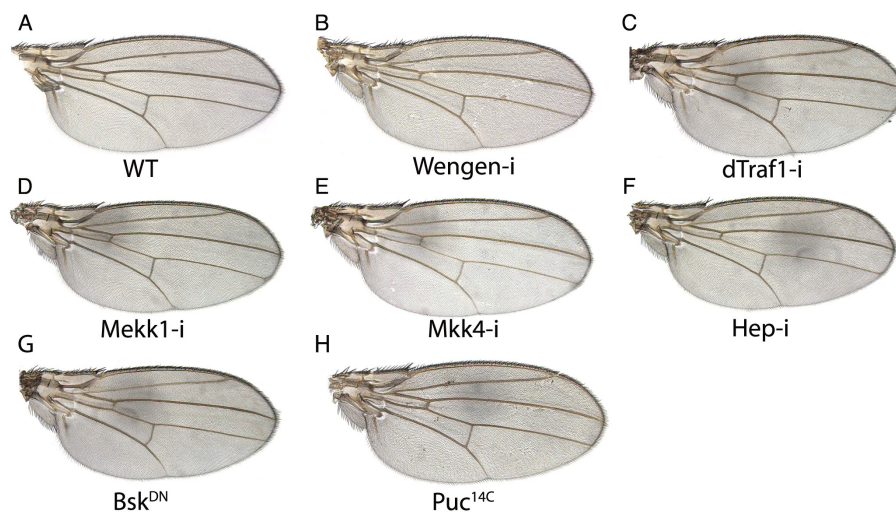


FIGURA R21: La reducción de la actividad de la ruta JNK no produce ningún fenotipo en el ala adulta

A-H) Alas con tamaño y patrón similares a los de un ala silvestre (A) resultantes de la inhibición de la ruta JNK por expresión de ARNi dirigidos contra sus diferentes miembros (B-F), por expresión de una versión dominante negativa de Basket (G) y por sobre-expresión de la fosfatasa Puckered (H). Todas las combinaciones de sobre-expresión se han llevado a cabo con la línea *nub-Gal4*, y en cada imagen está anotado el elemento de la ruta que ha sido afectado.

La reducción del número de células observada al activar la ruta JNK está provocada por un incremento de la apoptosis en el disco de ala, como se puede observar en discos de tercer estadio larvario de genotipo *nub-Gal4/UAS-bsk^{4Y}* (Fig. R1E). Cuando se induce la apoptosis también se ve afectada la proliferación. Este cambio en la proliferación es debido al fenómeno denominado “proliferación compensatoria” (Huh et al., 2004; Perez-Garijo et al., 2004) que consiste en que las células que se están muriendo inducen a las células vecinas a proliferar.

En resumen, los dos efectos fenotípicos causados por la sobre-expresión de MAP4K3, reducción del tamaño del ala e inducción de muerte celular en el disco imaginal, son similares a los observados cuando se incrementa la actividad de la ruta JNK. Debido a que la sobre-expresión de MAP4K3, también tiene fenotipos parecidos a la reducción de la actividad de la ruta TOR (reducción del tamaño y del número de células, así como fusión de vesículas lipídicas en el cuerpo graso) estudiamos mediante el análisis de combinaciones genéticas y técnicas bioquímicas el posible lugar de funcionamiento de MAP4K3 en estas rutas de señalización.

2.3.-Interacciones Genéticas y bioquímicas de MAP4K3 con InR/TOR.

2.3a.-Interacciones Genéticas.

Para estudiar la posible relación funcional entre las rutas de señalización InR/TOR y la proteína MAP4K3, realizamos combinaciones genéticas entre diferentes componentes de esta ruta y condiciones de ganancia y falta de función de MAP4K3. En primer lugar analizamos el efecto de la sobre-expresión de MAP4K3 en distintos fondos genéticos que modifican la actividad de la vía InR/TOR. Cuatro de los componentes clave de la señalización InR por encima del complejo TORC1 son la quinasa Dp110, la fosfatasa Pten, la quinasa Akt y el complejo Tsc1/2. El aumento de actividad de Dp110 o la pérdida de Pten llevan al aumento de los niveles de PI3P en la membrana, que recluta Akt para poder así activarlo. Una vez activo, Akt fosforila y reduce la actividad inhibidora de Tsc1/2 sobre las proteínas GTPasas Rheb que activan al complejo TORC1 (Potter et al., 2002). Cuando sobre-expresamos MAP4K3 en combinación con un ARNi de Pten, el fenotipo del tamaño de las células es intermedio, y el número de células y el tamaño del ala es más parecido a la sobre-expresión de MAP4K3 solo (Fig. R22C comparar con Fig. R22C' y R22A y R22B, Gráfica R22I y Tabla R6). De manera similar, la expresión ectópica de MAP4K3 rescata el fenotipo de pérdida de Tsc1/2 (Fig. R22D y R22E comparar con Fig. R22D' y R22E' respectivamente y con Fig. R22A y R22B, gráfica R22I y Tabla R6) o de activación de Akt (Fig. R22F comparar con Fig. R22F' y con Fig. R22A y R22B, Gráfica R 22I y Tabla R6) dando lugar a alas similares a la expresión de MAP4K3 solo. La reducción de Akt (Fig. R22G comparar con Fig. R22G' y con Fig. R22A y R22B, Gráfica R22I y Tabla R6) o Dp110 (Fig. R22H comparar con Fig. R22H' y con Fig. R22A y R22B, Gráfica R22I y Tabla R6) combinados con la sobre-expresión de MAP4K3 resultan en un fenotipo sinérgico de reducción de ala, tamaño y número de células (Gráfica R22I y Tabla R6). Estos resultados sugieren que los efectos producidos por altos niveles de señalización de la ruta InR son bloqueados o antagonizados por altos niveles de MAP4K3 por debajo (downstream) de Tsc1/2. La falta de rescate del fenotipo de tamaño con algunos de los miembros activados de la ruta InR genéticamente por encima (upstream) de TOR sugiere, junto con el fenotipo de fusión de vesículas lipídicas hallado en el cuerpo graso (apartado 1.5), que MAP4K3 sobre-expresada podría tener alguna función en la ruta TOR (detección en la célula de disponibilidad de aminoácidos en el organismo para poder crecer y proliferar).

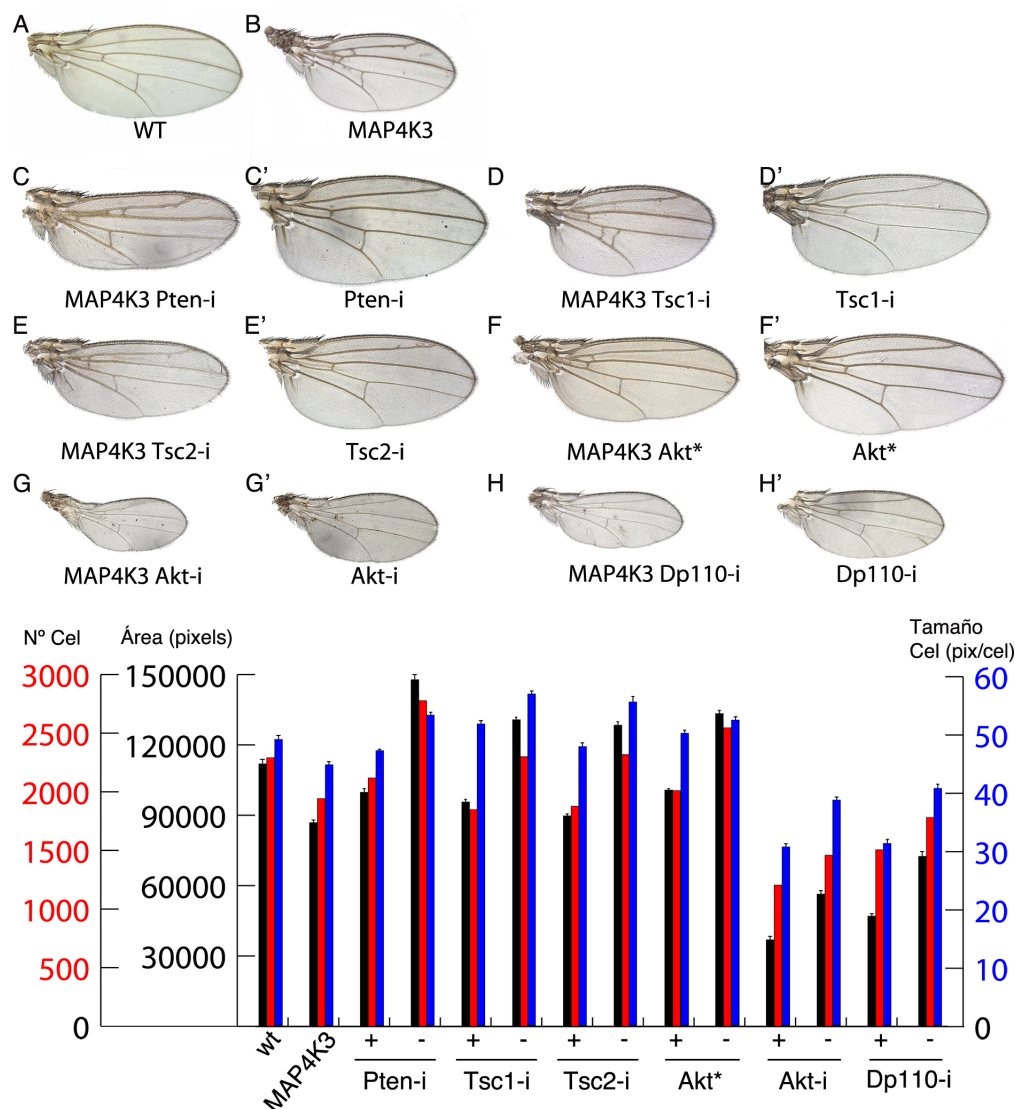


FIGURA R22: Fenotipos de las combinaciones genéticas entre MAP4K3 y diferentes elementos de las rutas InR/TOR.

A) Ala silvestre (WT). **B)** *nub-Gal4/UAS-MAP4K3* (MAP4K3). **C-C')** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3 / UAS-Pten-i* (MAP4K3 Pten-i; C) y *nub-Gal4 UAS-Pten-i* (Pten-i, C'). Cuando sobre-expresamos MAP4K3 en combinación con un ARNi de Pten, el fenotipo del tamaño de las células es intermedio, y el número de células y el tamaño del ala es más parecido a la sobre-expresión de MAP4K3 solo. **D-D')** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3/UAS-Tsc1-i* (MAP4K3 Tsc1, D) y *nub-Gal4 /UAS-Tsc1-i* (Tsc1-i, D'). **E-E')** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3/UAS-Tsc2-i* (MAP4K3 Tsc2, E) y *nub-Gal4 /UAS-Tsc2-i* (Tsc2-i, E'). La expresión ectópica de MAP4K3 rescata el fenotipo de aumento de tamaño producido por la falta de TSC1 y de 2. **F-F')** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3/UAS-Akt** (MAP4K3 Akt*, F) y *nub-Gal4 /UAS-Akt** (Akt*, F'). La expresión ectópica de MAP4K3 rescata el fenotipo de aumento de tamaño producido por Akt*. **G-G')** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3/UAS-Akt-i* (MAP4K3 Akt-i, G) y *nub-Gal4 /UAS-Akt-i* (Akt-i, F'). La expresión ectópica de MAP4K3 aumenta la reducción de ala, tamaño y número de células en combinación con Akt-i. **H-H')** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3/UAS-Dp110-i* (MAP4K3 Dp110-i, H) y *nub-Gal4/UAS-Dp110-i* (Dp110-i, H'). La expresión ectópica de MAP4K3 aumenta la reducción de ala, tamaño y número de células en combinación con Dp110-i. **I)** Representación gráfica de los valores numéricos del tamaño del ala (negro), número de células (rojo), y tamaño de células (azul) de las diferentes combinaciones mostradas en A-H'. Las columnas (+) corresponden a la combinación de la construcción indicada debajo con MAP4K3. Las columnas (-) corresponden al control de sobre-expresión de sólo la construcción indicada debajo.

		Área alas (píxeles)	t=	Número de células en región E dorsal	t=	n° Células total	Tamaño Células (pix/ cel)
nub/+		111869 (+/-2292)		66 (+/-2)		2282	49,02 (+/-2,1)
nub / MAP4K3		86840 (+/-2884)	7,97E-14	73 (+/-3)	6,48E-04	1944	44,67 (+/-2,3)
Pten-i	+	99761 (+/-4956)	6,23E-04	69 (+/-3)	0,029	2118	47,1 (+/-1,2)
	-	147783 (+/-4400)	3,52E-09	61 (+/-2)	2,39E-05	2778	53,19 (+/-2,2)
Tsc1-i	+	95619 (+/-5363)	6,42E-06	63 (+/-3)	1,27E-05	1851	51,67 (+/-2,2)
	-	130709 (+/-4441)	1,82E-13	57 (+/-4)	1,46E-03	2300	56,82 (+/-2,3)
Tsc2-i	+	89730 (+/-4649)	0,11	68 (+/-3)	0,015	1877	47,79 (+/-2,1)
	-	128382 (+/-4927)	8,00E-15	59 (+/-3)	2,46E-05	2317	55,4 (+/-2,4)
Akt*	+	100694 (+/-4820)	3,46E-10	65 (+/-3)	3,32E-09	2011	50,08 (+/-2)
	-	133298 (+/-5300)	8,56E-07	62 (+/-3)	2,33E-05	2597	52,33 (+/-2,2)
Akt-i	+	36823 (+/-925)	4,66E-15	106 (+/-1)	4,20E-10	1204	30,59 (+/-2,1)
	-	56360 (+/-3220)	6,86E-07	84 (+/-2)	2,58E-09	1459	38,63 (+/-1,9)
Dp110-i	+	46944 (+/-3637)	3,45E-11	87 (+/-3)	2,13E-04	1506	31,18 (+/-2,3)
	-	72446 (+/-3637)	5,57E-08	80 (+/-3)	1,77E-08	1783	40,63 (+/-2,1)

TABLA R6: Valores numéricos del tamaño de ala, número de células y tamaño celular de los fenotipos de las combinaciones genéticas entre MAP4K3 y diferentes elementos de las rutas InR/TOR.

Por consiguiente, decidimos analizar de manera pormenorizada los diferentes elementos de la ruta de señalización TOR implicados en la recepción de aminoácidos. Aunque esta parte de la vía de señalización no esté bien caracterizada, Pathetic (path) y Slimfast (slif) son dos transportadores de aminoácidos que están implicados en la transducción de la señal hacia TOR (Colombani et al., 2003; Goberdhan et al., 2005). La expresión de los ARNi de ambos no produce ningún cambio en el tamaño final del ala, pero sí produce variaciones en el número y tamaño de células (Fig. R18E y R18F respectivamente, Gráfica R18R y tabla R5) y la expresión ectópica de Slif produce el efecto contrario en el número de células

y tamaño de las mismas sin afectar al tamaño final del ala (Fig. R23E, Gráfica R23F y Tabla R7). Cuando sobre-expresamos MAP4K3 en estos fondos genéticos, las alas resultantes tienen un número de células, tamaño de células y tamaño del ala similar a la expresión ectópica de MAP4K3 solo (Fig. R23C, R23D y R23E comparar con R23C', R23D' y R23E' respectivamente y con R23A y R23B, Gráfica R23F y Tabla R7), indicando que MAP4K3 podría funcionar por debajo de los receptores de aminoácidos.

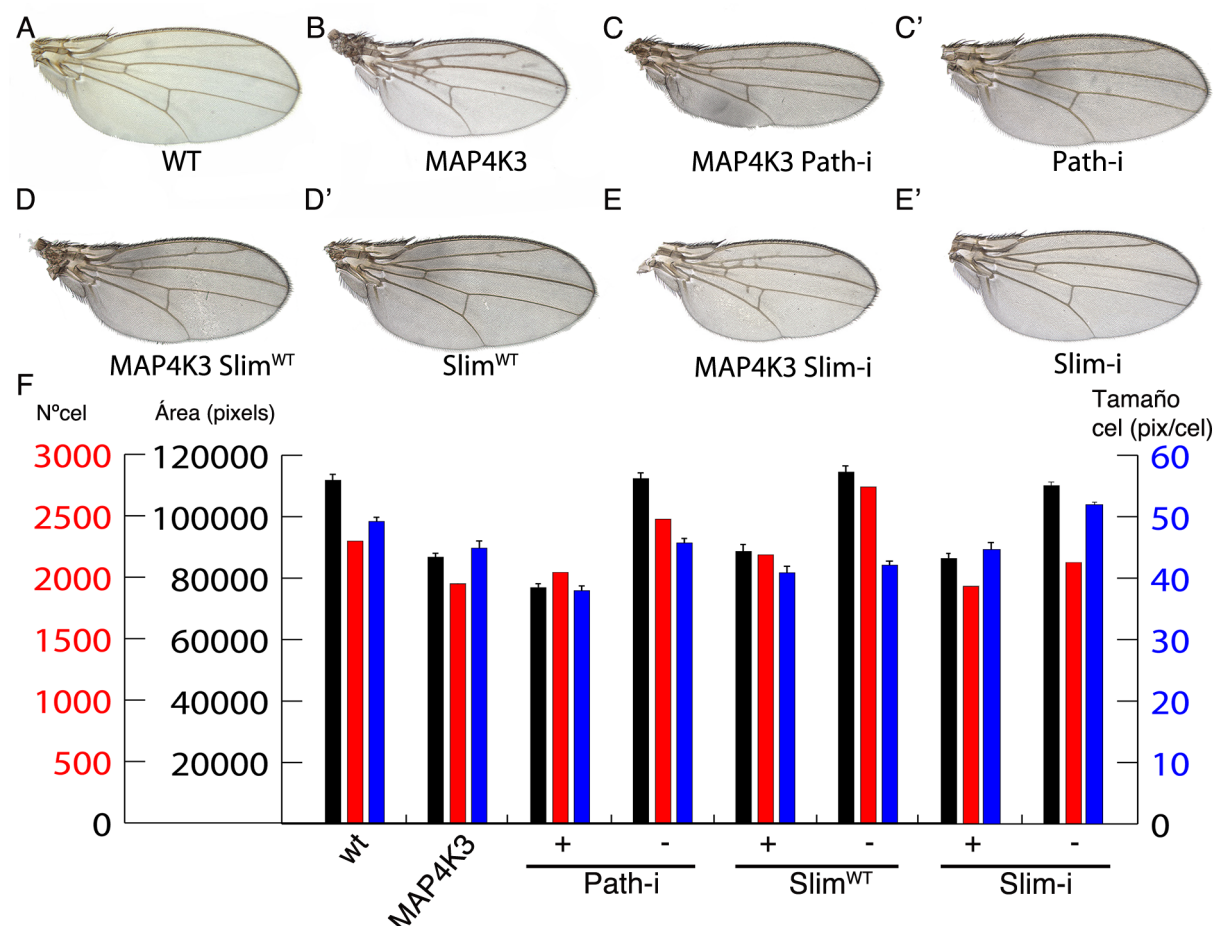


FIGURA R23: Fenotipos de las combinaciones genéticas entre MAP4K3 y los transportadores de aminoácidos implicados en la señalización por TOR

A) Ala silvestre (WT). **B)** *nub-Gal4/UAS-MAP4K3* (MAP4K3). **C-C')** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3/ UAS-path-i* (MAP4K3 Path-i, C) y *nub-Gal4/UAS-path-i* (Path-i, C'). La expresión ectópica de MAP4K3 rescata el fenotipo producido por path-i. **D-D')** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3/ UAS-slim^{WT}* (MAP4K3 Slim^{WT}, D), *nub-Gal4/UAS-slim^{WT}* (Slim^{WT}, D'). La expresión ectópica de MAP4K3 rescata el fenotipo producido por Slim^{WT}. **E-E')** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3/UAS-slim-i* (MAP4K3 Slim-i, E), *nub-Gal4/UAS-slim-i* (Slim-i, E'). La expresión ectópica de MAP4K3 rescata el fenotipo producido por Slim-i. **F)** Representación gráfica de los valores numéricos del tamaño del ala (barra negra), número de células (barra roja), y tamaño de células (barra azul) de las diferentes combinaciones mostradas en A-E'. Las columnas (+) corresponden a la combinación de la construcción indicada debajo con MAP4K3. Las columnas (-) corresponden al control de sobre-expresión de sólo la construcción indicada debajo.

		Área alas (píxeles)	t=	Número de células en región E dorsal	t=	n° Células total	Tamaño Células (pix/ cel)
nub/+		111869 (+/-2292)		66 (+/-2)		2282	49,02 (+/-2,1)
nub / MAP4K3		86840 (+/-2884)	7,97E-14	73 (+/-3)	6,48E-04	1944	44,67 (+/-2,3)
Path-i	+	76904 (+/-3631)	3,12E-06	86 (+/-3)	4,31E-07	2037	37,75 (+/-2,1)
	-	112409 (+/-4213)	2,35E-10	71 (+/-2)	1,51E-09	2470	45,52 (+/-2,4)
Slim ^{WT}	+	88713 (+/-2960)	0,79	80 (+/-3)	7,34E-08	2181	40,67 (+/-2,9)
	-	114512 (+/-3008)	9,16E-12	78 (+/-3)	4,50E-09	2733	41,91 (+/-2,6)
Slim-i	+	86409 (+/-4259)	6,43E-06	73 (+/-3)	3,32E-06	1934	44,67 (+/-3,1)
	-	110106 (+/-3988)	9,15E-12	63 (+/-2)	4,50E-09	2119	51,96 (+/-1,2)

TABLA R7: Valores numéricos del tamaño de ala, número de células y tamaño celular de los fenotipos de las combinaciones genéticas entre MAP4K3 y los transportadores de aminoácidos implicados en la señalización por TOR.

Funcionalmente, por debajo de los transportadores de aminoácidos se sitúa el complejo TORC1 que incluye a Raptor, RagA, RagC y TOR. Observamos una interacción sinérgica cuando co-expresamos junto con MAP4K3 una versión dominante negativa, el ARNi o una versión normal de TOR (Fig. R24C, R24D y R24E comparar con R24C', R24D' y R24E' respectivamente y con R24A y R24B, Gráfica R24F y tabla R8). Los fenotipos conllevan una reducción de todos los parámetros del ala analizados, es decir el tamaño celular y el número de células, y como consecuencia el tamaño final del ala. Encontramos resultados similares cuando utilizamos el ARNi de *raptor*, un componente clave del complejo TORC1 (Fig. R25C comparar con R25C', Gráfica R25I y Tabla R9). Las interacciones genéticas con RagA tanto en su forma normal (RagA^{WT}), dominante negativa (RagA^{T16N}), o activada (RagA^{Q65L}) fueron particularmente informativas. Así, la sobre-expresión de MAP4K3 en combinación con RagA^{Q65L} cancela los efectos provocados por la forma activada de RagA (Fig. R25D comparar con R25D' y con R25A y R25B, y Gráfica R25I y Tabla R9). De manera complementaria, la sobre-expresión de MAP4K3 produce un efecto sinérgico con RagA^{WT} y con RagA^{T16N} en el fenotipo de reducción de tamaño (Fig. R25E y R25F comparar con R25E' y R25F', y con R25A y R25B; Gráfica R25I y Tabla R9). En el caso de RagC, que funciona inversamente a RagA, en su versión activada presenta una interacción sinérgica en combinación con MAP4K3, aumentando la reducción del tamaño del ala (Fig. R25G comparar con R25G' y con R25A y R25B, Gráfica R25I y Tabla R9). La combinación con la versión dominante negativa RagC^{S45N} presenta un fenotipo similar al causado por la sobre-expresión de sólo MAP4K3 (Fig. R25H comparar con R25H' y con R25A y R25B, Gráfica R25I y Tabla R9). Estos resultados sugieren que MAP4K3 actúa genéticamente por debajo de las proteínas Rags y que los efectos de su expresión ectópica son extremadamente sensibles a los niveles de Raptor y TOR.

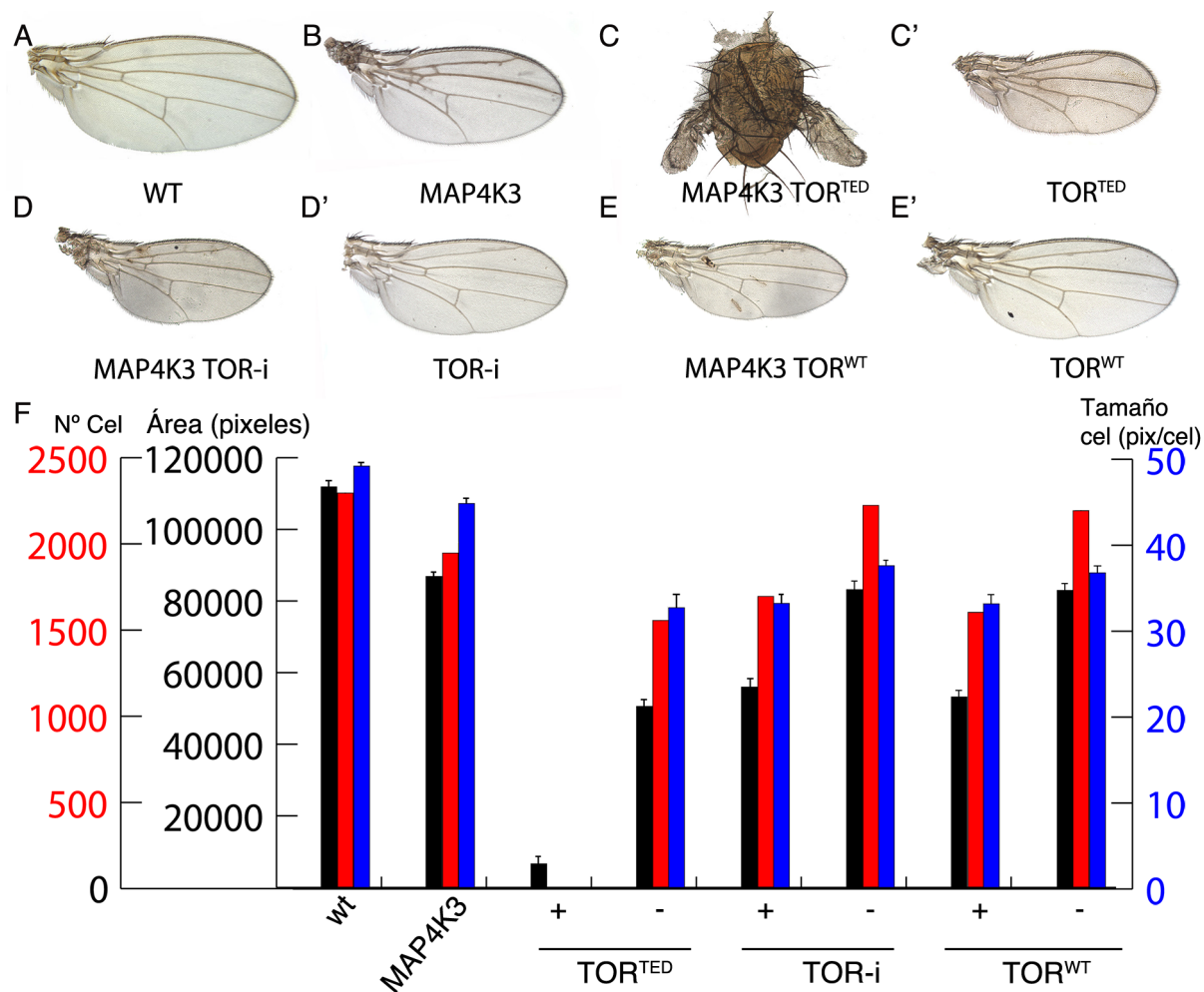


FIGURA R24: Fenotipos de las combinaciones genéticas entre MAP4K3 y diferentes formas de TOR

A) Ala silvestre (WT). **B)** *nub-Gal4/UAS-MAP4K3* (MAP4K3). **C-C')** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3/UAS-TOR^{DN}* (MAP4K3 TOR^{DN}, C) y *nub-Gal4/UAS-TOR^{DN}* (TOR^{DN}, C'). La expresión ectópica de MAP4K3 aumenta la reducción de ala, tamaño y número de células en combinación con TOR^{DN}. **D-D')** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3/UAS-TOR-i* (MAP4K3 TOR-i, D) y *nub-Gal4/UAS-TOR-i* (TOR-i, D'). La expresión ectópica de MAP4K3 aumenta la reducción de ala, tamaño y número de células en combinación con TOR-i. **E-E')** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3/UAS-TOR^{WT}* (MAP4K3 TOR^{WT}, E) y *nub-Gal4/UAS-TOR^{WT}* (TOR^{WT}, E'). La expresión ectópica de MAP4K3 aumenta la reducción de ala, tamaño y número de células en combinación con TOR^{WT}. **F)** Representación gráfica de los valores numéricos del tamaño del ala (barra negra), número de células (barra roja), y tamaño de células (barra azul) de las diferentes combinaciones mostradas en A-E'. Las columnas (+) corresponden a la combinación de la construcción indicada debajo con MAP4K3. Las columnas (-) corresponden al control de sobre-expresión de la construcción indicada debajo.

		Área alas (píxeles)	t=	Número de células en región E dorsal	t=	n° Células total	Tamaño Células (pix/cel)
nub/+		111869 (+/-2292)		66 (+/-2)		2282	49,02 (+/-2,1)
nub / MAP4K3		86840 (+/-2884)	7,97E-14	73 (+/-3)	6,48E-04	1944	44,67 (+/-2,3)
TOR ^{DN}	+	6615 (+/-3714)	6,80E-07	-		-	-
	-	50557 (+/-2265)	1,58E-08	100 (+/-10)	4,28E-07	1553	32,55 (+/-3,2)
TOR-i	+	55956 (+/-2607)	1,43E-13	98 (+/-3)	5,79E-07	1693	33,05 (+/-2,9)
	-	83154 (+/-4037)	1,10E-09	87 (+/-5)	3,76E-05	2221	37,44 (+/-2,7)
TOR ^{WT}	+	53210 (+/-4678)	3,12E-04	100 (+/-3)	7,39E-08	1600	33,2 (+/-3,1)
	-	82954 (+/-2738)	3,39E-04	86 (+/-3)	5,23E-05	2195	37,8 (+/-3)

TABLA R8: Valores numéricos del tamaño de ala, número de células y tamaño celular de los fenotipos las diferentes genéticas entre MAP4K3 y diferentes formas de TOR.

		Área alas (píxeles)	t=	Número de células en región E dorsal	t=	n° Células total	Tamaño Células (pix/cel)
nub/+		111869 (+/-2292)		66 (+/-2)		2282	49,02 (+/-2,1)
nub / MAP4K3		86840 (+/-2884)	7,97E-14	73 (+/-3)	6,48E-04	1944	44,67 (+/-2,3)
Raptor-i	+	48058 (+/-2816)	5,08E-15	112 (+/-2)	2,34E-06	1635	29,39 (+/-3,5)
	-	59900 (+/-4390)	5,51E-08	109 (+/-6)	0,67	2010	29,79 (+/-3)
RagA*	+	91233 (+/-3201)	4,76E-03	72 (+/-5)	0,71	2021	45,14 (+/-3,1)
	-	129914 (+/- 6264)	1,39E-10	68 (+/-3)	6,70E-02	2730	47,58 (+/-0,9)
RagA ^{WT}	+	71138 (+/-4217)	9,85E-09	71 (+/-4)	0,32	1550	45,89 (+/-2,9)
	-	101593 (+/-1647)	1,31E-04	71 (+/-2)	0,81	2226	45,65 (+/-2,8)
RagA ^{DN}	+	72990 (+/-2991)	4,95E-05	84 (+/-3)	4,29E-06	1880	38,82 (+/-3,2)
	-	94070 (+/-1597)	1,07E-11	75 (+/-3)	1,21E-05	2168	43,39 (+/-1,1)
RagC*	+	70662 (+/-3047)	4,05E-10	82 (+/-3)	3,73E-05	1772	39,8 (+/-3)
	-	97129 (+/-4271)	2,31E-11	71 (+/-4)	4,35E-05	2125	45,7 (+/-2,8)
RagC ^{DN}	+	85157 (+/-1086)	0,64	82 (+/-4)	8,29E-04	2590	45,08 (+/-1,3)
	-	116735 (+/-4283)	2,21E-06	72 (+/-3)	3,66E-04	2590	45,08 (+/-2,6)

TABLA R9: Valores numéricos del tamaño de ala, número de células y tamaño celular de los fenotipos de las combinaciones genéticas entre MAP4K3 y miembros del complejo TORC1.

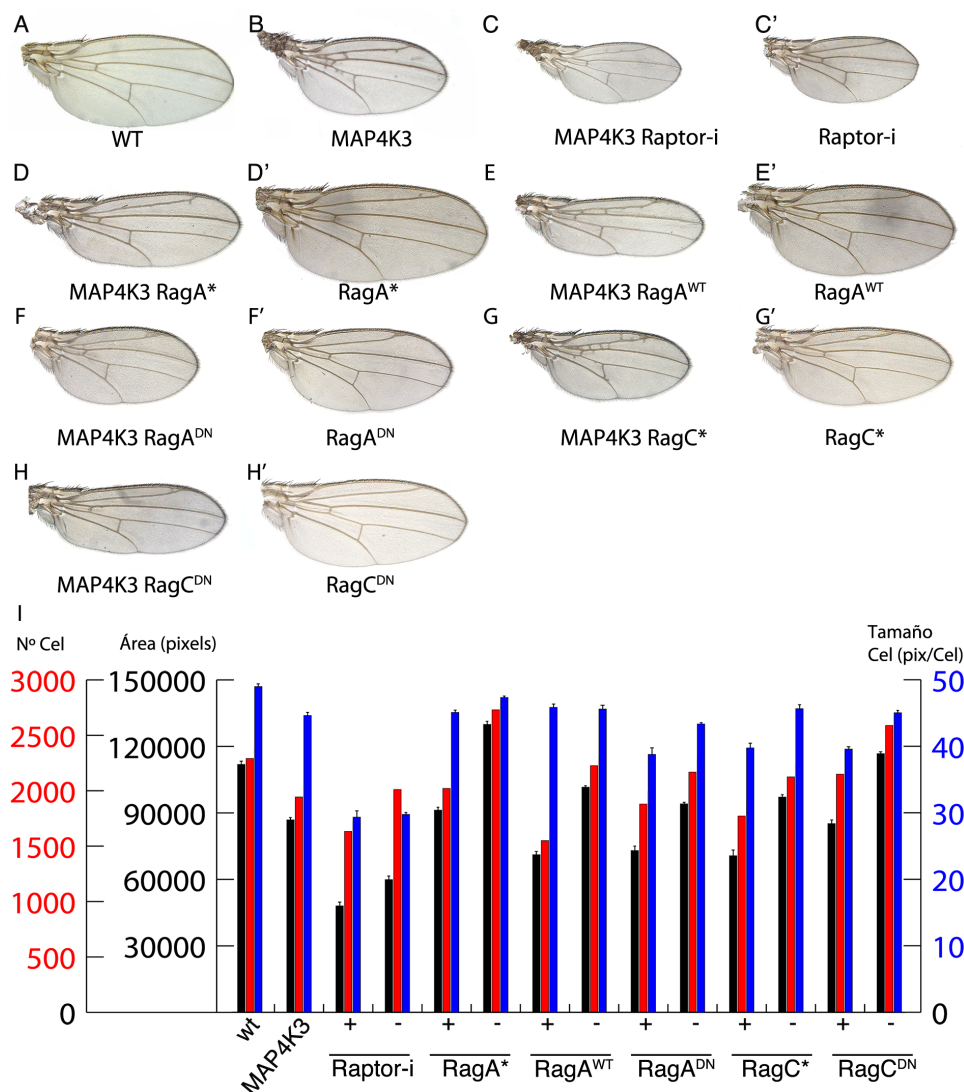


FIGURA R25: Fenotipos de las combinaciones genéticas entre MAP4K3 y miembros del complejo TORC1

A) Ala silvestre (WT). **B)** *nub-Gal4/UAS-MAP4K3* (MAP4K3). **C-C')** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3/ UAS-raptor-i* (MAP4K3 Raptor-i, C) y *nub-Gal4/UAS-raptor-i* (Raptor-i, C'). La reducción de Raptor combinada con la expresión ectópica de MAP4K3 produce un efecto sinérgico en la reducción del tamaño del ala, número y tamaño de células. **D-D')** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3/UAS-RagA** (MAP4K3 RagA*, D) y *nub-Gal4/UAS-RagA** (RagA*, D'). La sobre-expresión de MAP4K3 en combinación con RagA* cancela los efectos provocados por la forma activada de RagA. **E-E')** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3/UAS-RagA^{WT}* (MAP4K3 RagA^{WT}, E) y *nub-Gal4/UAS-RagA^{WT}* (RagA^{WT}, E'). La expresión ectópica de MAP4K3 aumenta la reducción de ala, tamaño y número de células en combinación con RagA^{WT}. **F-F')** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3/UAS-RagA^{DN}* (MAP4K3 RagA^{DN}, F), *nub-Gal4/UAS-RagA^{DN}* (RagA^{DN}, F'). La expresión ectópica de RagA^{DN} combinada con la de MAP4K3 produce un efecto sinérgico en el fenotipo de reducción de tamaño. **G-G')** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3/ UAS-RagC** (MAP4K3 RagC*, G), *nub-Gal4/UAS-RagC** (RagC*, G'). La expresión ectópica de MAP4K3 aumenta la reducción de ala, tamaño y número de células en combinación con RagC*. **H-H')** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3/ UAS-RagC^{DN}* (MAP4K3 RagC^{DN}, H), *nub-Gal4/UAS-RagC^{DN}* (RagC^{DN}, H'). La combinación con la versión dominante negativa RagC^{SN} presenta un fenotipo similar al causado por la sobre-expresión de MAP4K3 solo. **I)** Representación gráfica de los valores numéricos del tamaño del ala (barra negra), número de células (barra roja), y tamaño de células (barra azul) de las diferentes combinaciones mostradas en A-H'. Las columnas (+) corresponden a la combinación de la construcción indicada debajo con MAP4K3. Las columnas (-) corresponden al control de sobre-expresión de la construcción indicada debajo.

Finalmente, utilizamos diferentes formas de dS6K, uno de los principales componentes por debajo de TOR, en combinación con la expresión ectópica de MAP4K3. Observamos que el ARNi o una versión dominante negativa de dS6K causa un efecto sinérgico de reducción de tamaño del ala en combinación con la sobre-expresión de MAP4K3 (Fig. R26C y R26D comparar con R26C' y R26D', con R26A y R26B; Gráfica R26F y Tabla R10). Por otra parte también observamos que la expresión de una versión constitutivamente activa de dS6K rescata en parte la reducción en el tamaño celular causada por la sobre-expresión de MAP4K3 (Fig. R26E comparar con R26E' y con R26A y R26B, Gráfica R26F y Tabla R10). Estos resultados sugieren que MAP4K3 actúa genéticamente por encima de dS6K

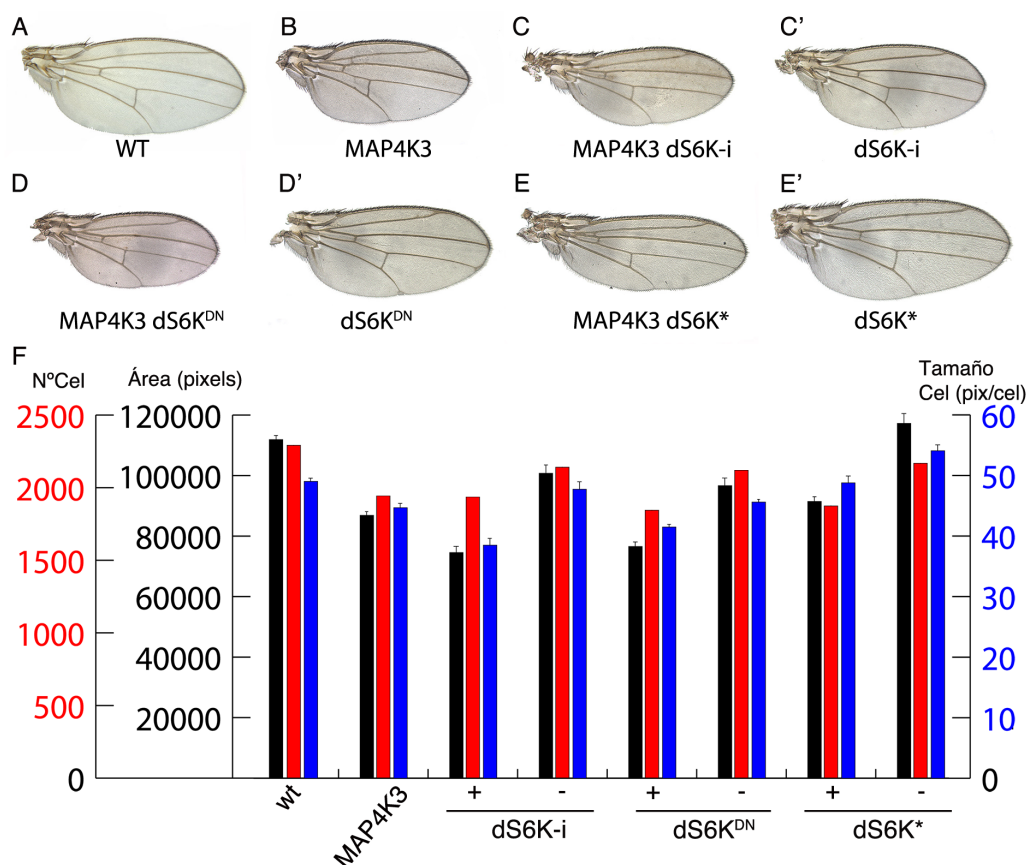


FIGURA R26: Fenotipos de las combinaciones genéticas entre MAP4K3 y diferentes versiones de dS6K

A) Ala silvestre (WT). **B)** *nub-Gal4/UAS-MAP4K3* (MAP4K3). **C-C')** *nub-gal4 UAS-MAP4K3/UAS-dS6K-i* (MAP4K3 dS6K-i, C) y *nub-Gal4/UAS-dS6K-i* (dS6K-i, C'). La expresión ectópica de dS6K-i combinada con la expresión ectópica de MAP4K3 produce un efecto sinérgico en la reducción del tamaño del ala, número y tamaño de células. **D-D')** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3/UAS-dS6K^{DN}* (MAP4K3 dS6K^{DN}, D) y *nub-Gal4/UAS-dS6K^{DN}* (dS6K^{DN}, D'). La expresión ectópica de dS6K^{DN} combinada con la expresión ectópica de MAP4K3 produce un efecto sinérgico en la reducción del tamaño del ala, número y tamaño de células. **E-E')** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3/UAS-dS6K** (MAP4K3 dS6K*, E) y *nub-Gal4/UAS-dS6K** (dS6K*, E'). La expresión de una versión constitutivamente activa de dS6K rescata en parte la reducción en el tamaño celular causada por la sobre-expresión de MAP4K3. **F)** Representación gráfica de los valores numéricos del tamaño del ala (barra negra), número de células (barra roja), y tamaño de células (barra azul) de las diferentes combinaciones mostradas en A-E'. Las columnas (+) corresponden a la combinación de la construcción indicada debajo con MAP4K3. Las columnas (-) corresponden al control de sobre-expresión de la construcción indicada debajo.

		Área alas (píxeles)	t=	Número de células en región E dorsal	t=	n° Células total	Tamaño Células (pix/ cel)
nub/+		111869 (+/-2292)		66 (+/-2)		2282	49,02 (+/-2,1)
nub / MAP4K3		86840 (+/-2884)	7,97E-14	73 (+/-3)	6,48E-04	1944	44,67 (+/-2,3)
dS6K-i	+	74550 (+/-4745)	4,52E-06	84 (+/-6)	1,94E-03	1937	38,49 (+/-2,1)
	-	102167 (+/-7159)	2,72E-08	68 (+/-4)	2,01E-04	2141	47,72 (+/-3,2)
dS6K ^{DN}	+	76548 (+/-4475)	1,78E-05	78 (+/-3)	3,90E-03	1845	41,49 (+/-2,7)
	-	96679 (+/-2824)	3,29E-04	71 (+/-2)	1,05E-04	2120	45,6 (+/-1,9)
dS6K*	+	91438 (+/-2198)	7,13E-04	66 (+/-2)	4,72E-03	1874	48,78 (+/-2,5)
	-	117226 (+/-3740)	1,94E+04	60 (+/-3)	1,83E-03	2168	54,08 (+/-2,7)

TABLA R10: Valores numéricos del tamaño de ala, número de células y tamaño celular de los fenotipos de las combinaciones genéticas entre MAP4K3 y diferentes versiones de dS6K.

Para completar este análisis, realizamos interacciones genéticas en condiciones de menores niveles de expresión de MAP4K3, utilizando un ARNi de MAP4K3. En la mayoría de estas combinaciones, con *UAS-RagA^{WT}* (Fig. R27C), *UAS-RagA^{Q65L}* (Fig. R27D), *UAS-RagA^{T16N}* (Fig. R27E), *UAS-RagC^{S45N}* (Fig. R27F), *UAS-RagC^{Q99L}* (Fig. R27G), *UAS-raptor-i* (Fig. R27H), *UAS-dS6K^{TE}* (Fig. R27I), *UAS-dS6K-i* (Fig. R27J), *UAS-Pten-i* (Fig. R27K), *UAS-AKT** (Fig. R27L) y *UAS-Tsc1-i* (Fig. R27M) los fenotipos resultantes fueron aditivos (Gráfica R27N y Tabla R11). Sin embargo, los fenotipos a debidos la sobre-expresión de una versión dominante negativa de TOR (*UAS-TOR^{TEP}*; Fig. R28B y D), son rescatados por la reducción de los niveles de MAP4K3 (Fig. R28C y E comparar con Fig. R28B y D respectivamente), efecto que comentaremos más adelante en la discusión.

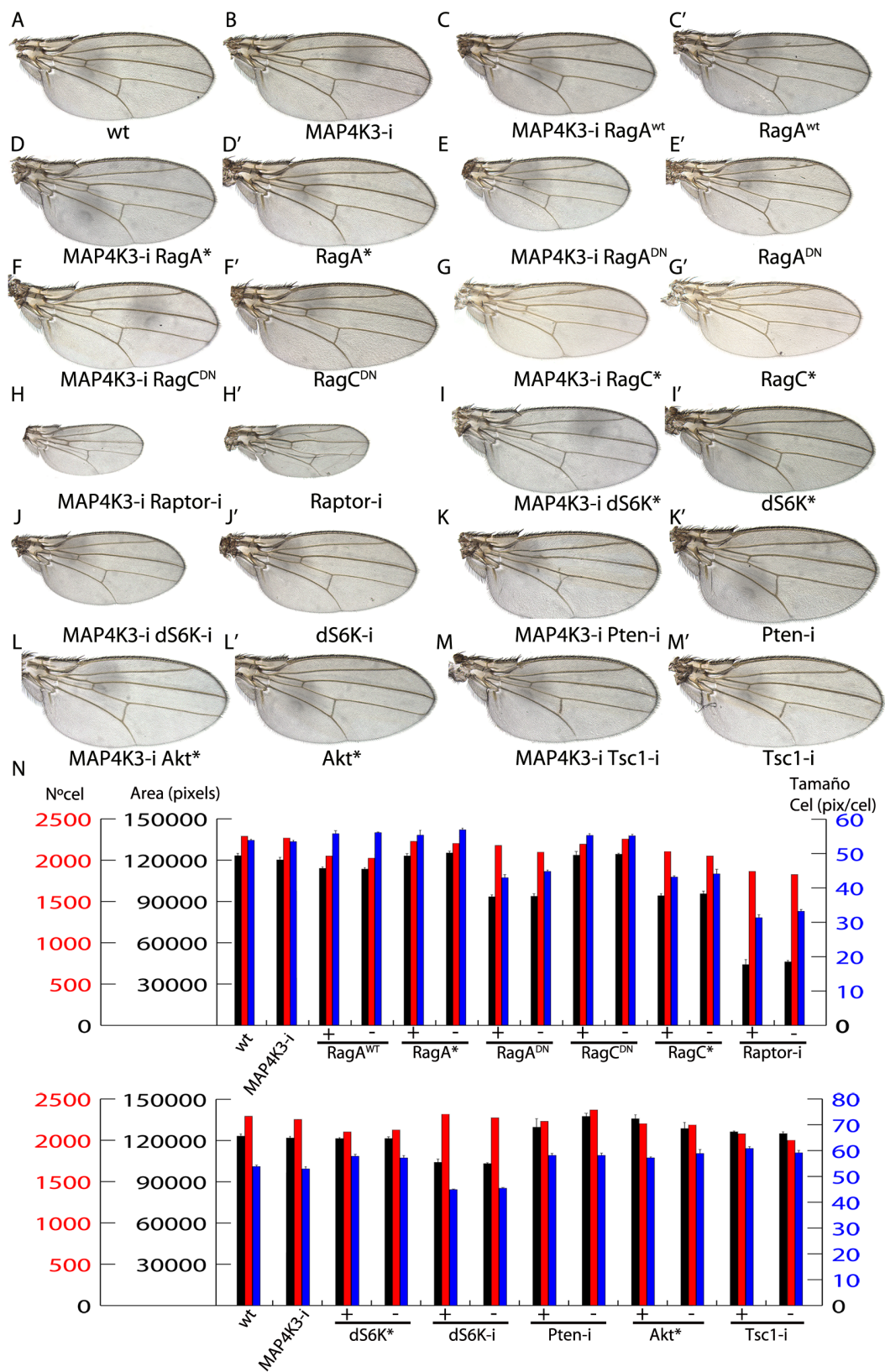


FIGURA R27: Fenotipos de las combinaciones genéticas entre MAP4K3-i y miembros de la ruta InR y TOR.

A) Ala silvestre (WT). **B)** *638-Gal4/+; UAS-MAP4K3/+* (MAP4K3). **C-C')** *638-Gal4/+; UAS-MAP4K3/UAS-RagA^{WT}* (MAP4K3 RagA^{WT}, C) y *638-Gal4/+; UAS-RagA^{WT}* (RagA^{WT}, C'). La expresión ectópica de RagA^{WT} combinada con la expresión ectópica de MAP4K3 produce un efecto aditivo. **D-D')** *638-Gal4/+; UAS-MAP4K3/UAS-RagA** (MAP4K3 RagA*, D) y *638-Gal4/+; UAS-RagA** (RagA*, D'). La expresión ectópica de RagA* combinada con la expresión ectópica de MAP4K3 produce un efecto aditivo. **E-E')** *638-Gal4/+; UAS-MAP4K3/UAS-RagA^{DN}* (MAP4K3 RagA^{DN}, E) y *638-Gal4/+; UAS-RagA^{DN}* (RagA^{DN}, E'). La expresión ectópica de RagA^{DN} combinada con la expresión ectópica de MAP4K3 produce un efecto aditivo. **F-F')** *638-Gal4/+; UAS-MAP4K3/UAS-RagC^{DN}* (MAP4K3 RagC^{DN}, F) y *638-Gal4/+; UAS-RagC^{DN}* (RagC^{DN}, F'). La expresión ectópica de RagC^{DN} combinada con la expresión ectópica de MAP4K3 produce un efecto aditivo. **G-G')** *638-Gal4/+; UAS-MAP4K3/UAS-RagC** (MAP4K3 RagC*, G) y *638-Gal4/+; UAS-RagC** (RagC*, G'). La expresión ectópica de RagC* combinada con la expresión ectópica de MAP4K3 produce un efecto aditivo. **H-H')** *638-Gal4/+; UAS-MAP4K3/UAS-raptor-i* (MAP4K3 Raptor-i, H) y *638-Gal4/+; UAS-raptor-i* (Raptor-i, H'). La expresión ectópica de raptor-i combinada con la expresión ectópica de MAP4K3 produce un efecto aditivo. **I-I')** *638-Gal4/+; UAS-MAP4K3/UAS-dS6K** (MAP4K3 dS6K*, I) y *638-Gal4/+; UAS-dS6K** (dS6K*, I'). La expresión ectópica de dS6K* combinada con la expresión ectópica de MAP4K3 produce un efecto aditivo. **J-J')** *638-Gal4/+; UAS-MAP4K3/UAS-dS6K-i* (MAP4K3 dS6K-i, J) y *638-Gal4/+; UAS-dS6K-i* (dS6K-i, J'). La expresión ectópica de dS6K-i combinada con la expresión ectópica de MAP4K3 produce un efecto aditivo. **K-K')** *638-Gal4/+; UAS-MAP4K3/UAS-Pten-i* (MAP4K3 Pten-i, K) y *638-Gal4/+; UAS-Pten-i* (Pten-i, K'). La expresión ectópica de Pten-i combinada con la expresión ectópica de MAP4K3 produce un efecto aditivo. **L-L')** *638-Gal4/+; UAS-MAP4K3/UAS-Akt** (MAP4K3 Akt*, L) y *638-Gal4/+; UAS-Akt** (Akt*, L'). La expresión ectópica de Akt* combinada con la expresión ectópica de MAP4K3 produce un efecto aditivo. **M-M')** *638-Gal4/+; UAS-MAP4K3/UAS-Tsc1-i* (MAP4K3 Tsc1-i, M) y *638-Gal4/+; UAS-Tsc1-i* (Tsc1-i, M'). La expresión ectópica de Tsc1-i combinada con la expresión ectópica de MAP4K3 produce un efecto aditivo. **N)** Representación gráfica de los valores numéricos del tamaño del ala (barra negra), número de células (barra roja), y tamaño de células (barra azul) de las diferentes combinaciones mostradas en A-E'. Las columnas (+) corresponden a la combinación de la construcción indicada debajo con MAP4K3. Las columnas (-) corresponden al control de sobre-expresión de solo la construcción indicada debajo.

		Área alas (píxeles)	t=	Número de células en región E dorsal	t=	n° Células total	Tamaño Células (pix/ cel)
638/+		123202 (+/-1378)		60 (+/-1)		2288	53,83 (+/-2,1)
MAP4K3-i		117342 (+/-2446)	1,75E-05	62 (+/-2)	2,13E-05	2250	52,9 (+/-2,2)
RagA ^{WT}	+	114017 (+/-2877)	3,62E-07	58 (+/-2)	9,87E-08	2050	55,7 (+/-2,1)
	-	113481 (+/-3264)	7,13E-07	58 (+/-3)	6,96E-02	2025	56,03 (+/-1,2)
RagA*	+	123067 (+/-4036)	9,33E-03	59 (+/-2)	1,22E-07	2227	55,27 (+/-3,4)
	-	125177 (+/-3943)	7,34E-09	57 (+/-3)	8,77E-03	2203	57,83 (+/-1,9)

RagA ^{DN}	+	93390 (+/-6665)	1,41E-09	76 (+/-4)	1,15E-08	2178	42,88 (+/-2,4)
	-	93736 (+/-2673)	2,32E-14	73 (+/-7)	4,07E-04	2096	44,72 (+/-2,1)
RagC ^{DN}	+	123566 (+/-3124)	3,72E-09	58 (+/-4)	9,85E-05	2193	55,2 (+/-2,5)
	-	124284 (+/-4672)	3,82E-06	59 (+/-3)	3,82E-06	2256	55,08 (+/-2,8)
RagC*	+	94125 (+/-2314)	3,42E-11	72 (+/-2)	3,56E-12	2105	43,08 (+/-1,9)
	-	95550 (+/-3214)	1,33E-06	70 (+/-2)	7,34E-09	2050	44,01 (+/-2,1)
Raptor-i	+	44155 (+/-2138)	2,67E-08	135 (+/-4)	8,76E-06	1864	31,25 (+/-3,1)
	-	46125 (+/-3124)	6,00E-10	137 (+/-8)	1,20E-10	1825	33,13 (+/-2,4)
dS6K*	+	121422 (+/-3260)	3,89E-08	56 (+/-2)	6,48E-06	2100	57,8 (+/-2,6)
	-	121476 (+/-4150)	3,83E-12	57 (+/-3)	3,93E-06	2125	57,16 (+/-3,2)
dS6K-i	+	104125 (+/-2430)	4,84E-05	73 (+/-2)	8,46E-10	2315	44,86 (+/-1,1)
	-	103207 (+/-3124)	2,59E-05	72 (+/-5)	1,76E-05	2271	45,45 (+/-0,9)
Pten-i	+	129668 (+/-8259)	4,56E-02	56 (+/-4)	4,76E-03	2230	58,14 (+/-3,2)
	-	137556 (+/-3516)	2,45E-04	56 (+/-3)	1,33E-03	2366	58,14 (+/-3,4)
Akt*	+	135832 (+/-3217)	3,52E-08	52 (+/-3)	4,63E-06	2201	57,15 (+/-0,8)
	-	128716 (+/-5799)	2,34E-06	55 (+/-2)	4,26E-05	2186	58,88 (+/-2,3)
Tsc1-i	+	126306 (+/-1379)	3,49E-05	53 (+/-2)	7,90E-05	2077	60,81 (+/-2,7)
	-	125000 (+/-3988)	8,39E-08	52 (+/-1)	4,22E-09	2001	59,13 (+/-3,2)

TABLA R11: Valores numéricos del tamaño de ala, número de células y tamaño celular de alas de combinaciones genéticas entre MAP4K3-i y miembros de la ruta InR y TOR.

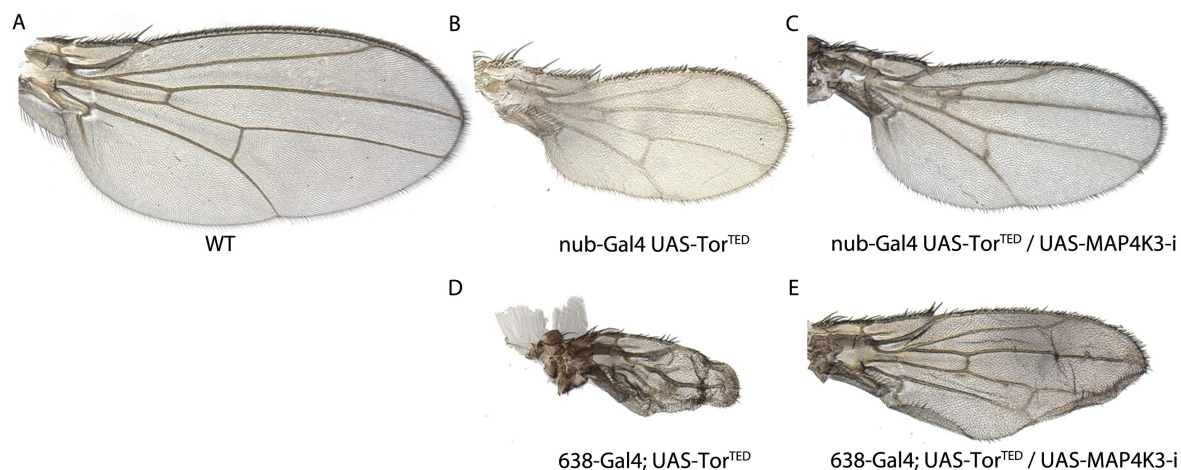


FIGURA R28: Fenotipos de las combinaciones genéticas entre MAP4K3-i y TOR^{DN}

A) Ala silvestre (WT). **B-C)** *nub-Gal4/UAS-TOR^{DN}* (B) y *nub-Gal4 UAS-TOR^{DN}/UAS-MAP4K3-i/+* (C). **D-E)** *638-Gal4/+; UAS-TOR^{DN}/+* (D) y *638-Gal4/+; UAS-TOR^{DN}/UAS-MAP4K3-i/* (E). La reducción de los niveles de MAP4K3 rescata los fenotipos de reducción de tamaño del ala producidos por la expresión de la forma dominante-negativa de TOR.

2.3b.- Experimentos de interacción bioquímica con miembros del complejo TORC1

Los resultados de las interacciones genéticas con diferentes miembros de la ruta de señalización TOR y la naturaleza molecular de MAP4K3, cuya familia de proteínas tiene afinidad por proteínas GTPasas, sugieren que MAP4K3 podría estar bioquímicamente relacionada con el complejo TORC1. Para confirmar si existe una interacción física entre MAP4K3 y algún miembro del complejo TORC1 realizamos experimentos de “pull-down” (ver Materiales y Métodos). Encontramos que MAP4K3 se une de manera directa y con gran afinidad a RagC (Fig. R29A) y de una manera más débil a TOR y RagA (Fig. R29B y R29C). MAP4K3, sin embargo, no interacciona con la GTPasa Rheb (Fig. R29D). Estos resultados concuerdan con los hallados en inmunoprecipitaciones llevadas a cabo en cultivo de células S2 de *Drosophila* (Bryk et al.2010).

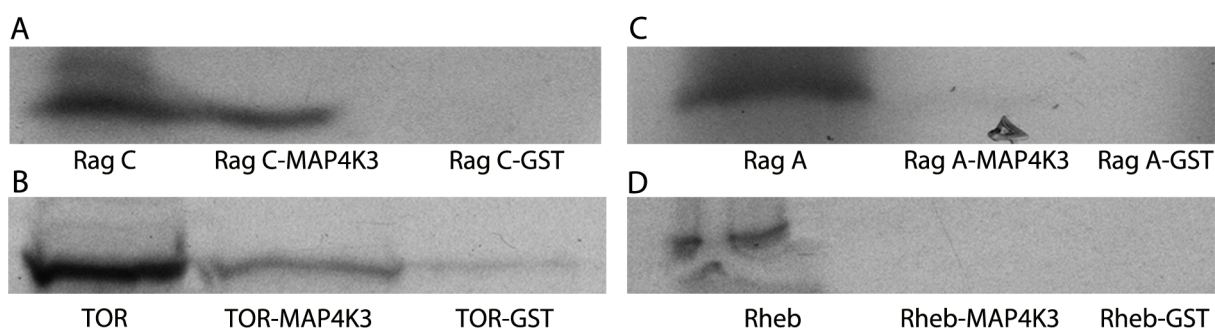


FIGURA R29: Ensayo de “pull-down” entre MAP4K3 y diferentes miembros del complejo TORC1

A) MAP4K3 se une de manera directa y con gran afinidad a RagC. **B-C)** MAP4K3 se une de manera directa y con una menor afinidad a TOR (B) y RagA (C). **D)** MAP4K3 no se une a Rheb. En cada autorradiografía la línea de la izquierda corresponde a la traducción *in vitro*, la línea central al ensayo de interacción directa con MAP4K3-GST y la línea de la derecha al control de interacción con la proteína GST.

2.4.- Interacciones Genéticas de MAP4K3 con la ruta de señalización JNK

Con el fin de identificar una relación funcional entre la ruta de señalización JNK y la proteína MAP4K3, realizamos combinaciones en condiciones de falta y ganancia de MAP4K3 en fondos genéticos con la actividad JNK modificada. Ya que la sobre-expresión en el disco de ala de MAP4K3 produce un importante incremento de la actividad JNK observado por la inducción tanto de *puc* (utilizando *puc-lacZ* como un reportero de la actividad de la ruta JNK) como de Cas3 activada (Fig. R15 y R11 respectivamente), utilizamos la variación de los niveles de muerte celular como marcador para visualizar posibles relaciones epistáticas. Utilizando diferentes construcciones ARNi que inhiben la ruta JNK en condiciones de sobre-expresión de MAP4K3 encontramos que con *dTraf1-i* no existe ningún cambio en los niveles de Cas3 activada (Fig. R30B comparar con Fig. 30 A y el control B'). En cambio cuando utilizamos *hep-i* o *msn-i* observamos que se reducen los niveles de Cas3 activada causados por la sobre-expresión de MAP4K3 (Fig. R30C, D comparar con Fig. R30 A y el control C' y D'). Esta reducción es similar a la observada en combinaciones con el inhibidor de la ruta Puc (Fig. R30E comparar con Fig. R30 A y el control E'). Estos resultados sugieren que la función de MAP4K3 se sitúa genéticamente entre los genes *dTraf1* y *msn*.

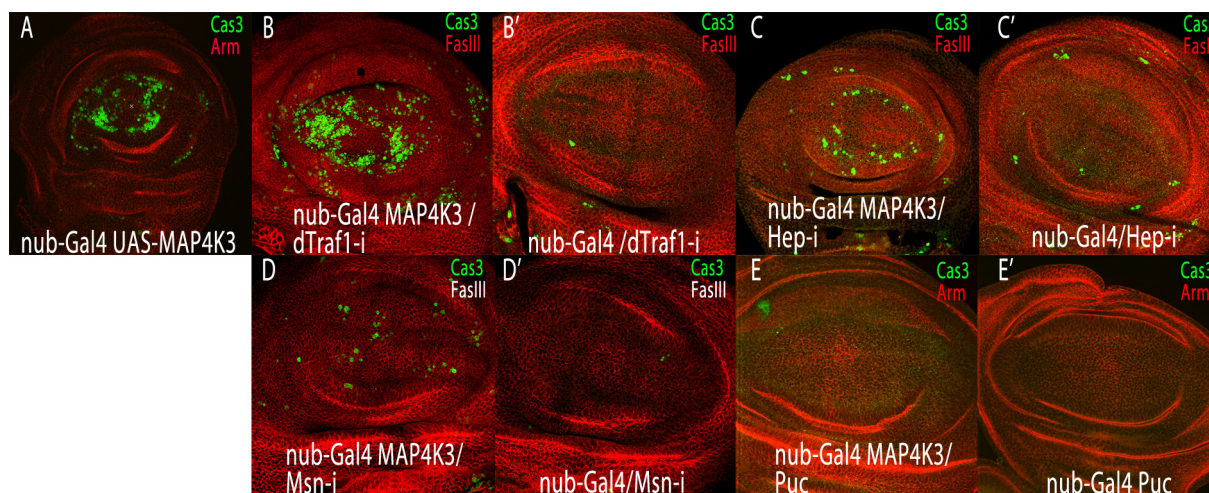


FIGURA R30: Análisis de la muerte celular en discos de ala de combinaciones genéticas entre MAP4K3 y miembros de la ruta JNK

En todos los casos la expresión de Cas3 activada se muestra en verde y la expresión de FasIII en rojo (salvo que se indique lo contrario). **A)** *nub-Gal4/UAS-MAP4K3*. **B-B')** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3/UAS-dTraf1-i* (B) y *nub-Gal4/UAS-dTraf1-i* (B'). La reducción de los niveles de dTraf1 no afecta a la inducción de muerte celular causada por la sobre-expresión de MAP4K3. **C-C')** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3/UAS-hep-i* (C) y *nub-Gal4/UAS-hep-i* (C'). **D-D')** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3/UAS-msn-i* (D) y *nub-Gal4/UAS-msn-i* (D'). **E-E')** *nub-Gal4 UAS-MAP4K3/UAS-puc* (E) y *nub-Gal4/UAS-puc* (E'). La reducción de la expresión de Hep o Msn, así como la sobre-expresión de Puc reducen la muerte celular inducida por la sobre-expresión de MAP4K3. Estos resultados sugieren que la función de MAP4K3 se sitúa genéticamente entre los genes *dTraf1* y *msn*.

Como hemos podido ver, el exceso de MAP4K3 causa la activación de JNK por encima de la proteína Msn y tiene un efecto dominante negativo en la vía TOR a nivel de las proteínas Rags. Los resultados genéticos se basan principalmente en un estudio de la sobre-expresión de la proteína, pero para saber si existe alguna clase de requerimiento de la proteína en la función normal de estas vías es necesario estudiar su requerimiento en condiciones de falta de función.

3.-GENERACIÓN Y ANÁLISIS DE CONDICIONES DE FALTA DE FUNCIÓN DE MAP4K3

3.1.-Reducción de los niveles de expresión de MAP4K3 mediante ARNi.

Para reducir los niveles de proteína MAP4K3 en primer lugar hemos utilizado una construcción UAS-MAP4K3-RNAi, que nos permite en combinación con diferentes líneas Gal4 reducir la cantidad de ARNm. La expresión del ARNi de MAP4K3 en el disco de ala produce una fuerte disminución de los niveles de la proteína (Fig. R31E y E'), y es capaz de suprimir el fenotipo de sobre-expresión de la línea *EP-704* (Fig. R31C comparar con B). Sin embargo, en combinaciones de este ARNi con diferentes líneas Gal4 de expresión en el ala y cuerpo graso no se observa ningún fenotipo (Fig. R31D comparar con A y G comparar con F).

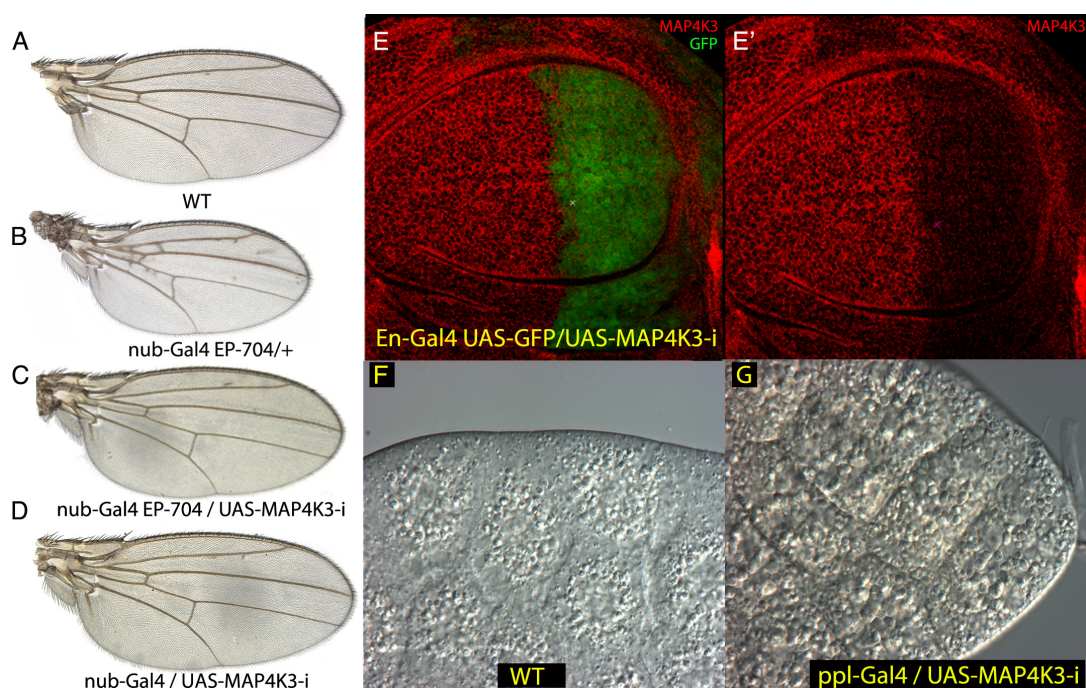


FIGURA R31: Análisis de la reducción de los niveles de MAP4K3 por expresión de su ARN de interferencia

A) Ala silvestre (WT). **B)** *nub-Gal4 EP-704/+*. **C)** *nub-Gal4 EP-704/UAS-MAP4K3-i*. La reducción de los niveles de expresión de MAP4K3 suprime el fenotipo de sobre-expresión de la línea *EP-704*. **D)** *nub-Gal4/UAS-MAP4K3-i*. La reducción de los niveles de MAP4K3 no causa ningún fenotipo en el ala. **E-E')** Disco imaginal de ala de tercer estadio de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP/UAS-MAP4K3-i*. La expresión del ARNi de MAP4K3 en el compartimento posterior (marcado en verde por la expresión de GFP) reduce considerablemente los niveles de la proteína MAP4K3 (rojo). **F)** Cuerpo graso silvestre. **G)** Cuerpo graso de genotipo *ppl-Gal4/UAS-MAP4K3-i*. La distribución y tamaño de las vesículas no se afectan por la reducción de los niveles de MAP4K3.

Estos resultados sugieren que la reducción en los niveles de MAP4K3 causados por la expresión de su ARNi no es suficiente para identificar los posibles requerimientos de esta proteína durante el desarrollo normal.

3.2.-La línea *EP-704* como mutante.

La línea *EP-704* está insertada en la región 5'UTR del gen *Map4k3* (*CG7097*) (Fig. R5). En individuos homocigóticos para esta inserción observamos un descenso del 85% en los niveles de ARNm del gen *Map4k3* (Fig. R32D), indicando que el elemento P-UAS reduce la transcripción del gen. Los individuos *EP-704* son viables y presentan una reducción en el tamaño del ala del 10% que es debida a una disminución en el tamaño de las células (Fig. R32B, Gráfica R32E y Tabla R12). También observamos que estas moscas homocigóticas sufren un retraso en el desarrollo de 2 días, al igual que se ha descrito para otros mutantes de este gen (Bryk et al.) y en genes relacionados con las vías InR/TOR (Zhang et al., 2000). En combinaciones de la línea *EP-704* con una deficiencia de la región (*Df(2L)6069*) observamos los mismos fenotipos de retraso en el desarrollo y disminución del tamaño celular (Fig. 32C, Gráfica R32E y Tabla R12).

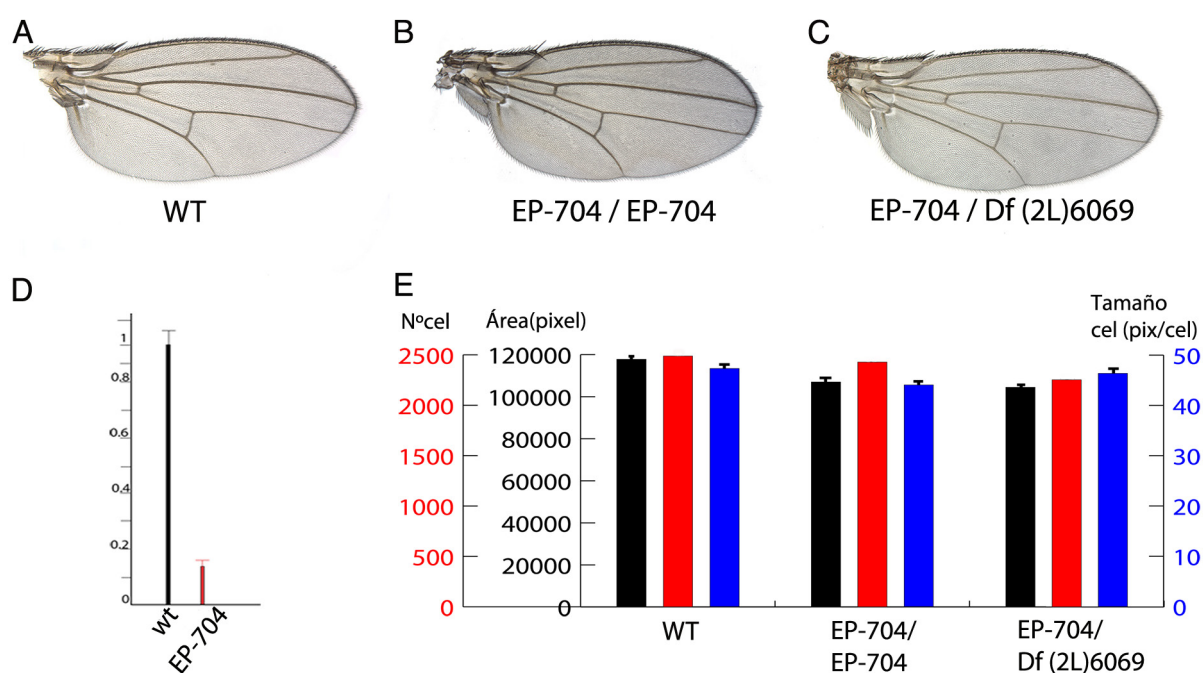


FIGURA R32: Fenotipo en el ala de falta de función producido por la inserción *EP-704*

A) Ala silvestre (WT). **B)** Ala de moscas homocigóticas *EP-704/EP-704*. La inserción *EP-704* es viable en homocigosis y las alas presentan una reducción en su tamaño del 10% que es debida a una disminución en el tamaño de las células. **C)** *EP-704/Df(2L)6069*. La combinación de la línea *EP-704* con una deficiencia de la región (*Df(2L)6069*) es también viable, y causa una disminución del tamaño del ala también de un 10%. **D)** Cuantificación de los niveles de ARNm del gen *CG7097* mediante RT-PCR en individuos homocigóticos para la inserción *EP-704* (*EP-704*) y en individuos silvestres (wt). La reducción en los niveles de ARNm causada por la inserción *EP-704* es del 85%. **E)** Representación gráfica de los valores numéricos del tamaño del ala (negro), número de células (rojo), y tamaño de células (azul) de las diferentes combinaciones mostradas en A-C.

	Área alas (píxeles)	t=	Número de células en región E dorsal	t=	nº Células total	Tamaño Células (pix/cel)
wt	117808 (+/-2792)		69 (+/-5)		2489	47,33 (+/-2)
EP704/EP704	106990 (+/-2899)	1,67E-04	74 (+/-3)	5,17E-02	2428	44,07 (+/-1,9)
EP704/Df(2L)6069	104469 (+/-2615)	3,10E-03	72 (+/-2)	0,69	2253	46,36 (+/-2,1)

TABLA R12: Valores numéricos del tamaño de ala, número de células y tamaño celular de los fenotipos en el ala de falta de función producido por la inserción de la línea EP-704.

3.3.-Generación y análisis de mutantes de falta de función para el gen *Map4k3*.

Para generar condiciones más fuertes de falta de función del gen *Map4k3* indujimos mutaciones de falta de función en un cromosoma EP-704. La combinación EP-704/*act-Gal4* es letal durante el desarrollo pupal, por lo que mutaciones que afectaran al gen *Map4k3* deberían comportarse como supresoras de esta letalidad. Para inducir los mutantes de falta de función tratamos machos homocigóticos isogénicos para la línea EP-704 con ENU (etil nitroso urea), un agente mutagénico que produce sustituciones de bases (ver Materiales y Métodos). Estos machos fueron cruzados en masa por hembras de genotipo *act-Gal4/CyO*, y de este cruce se seleccionaron aquellos individuos viables de genotipo EP-704/*act-Gal4* (Fig. R33A).

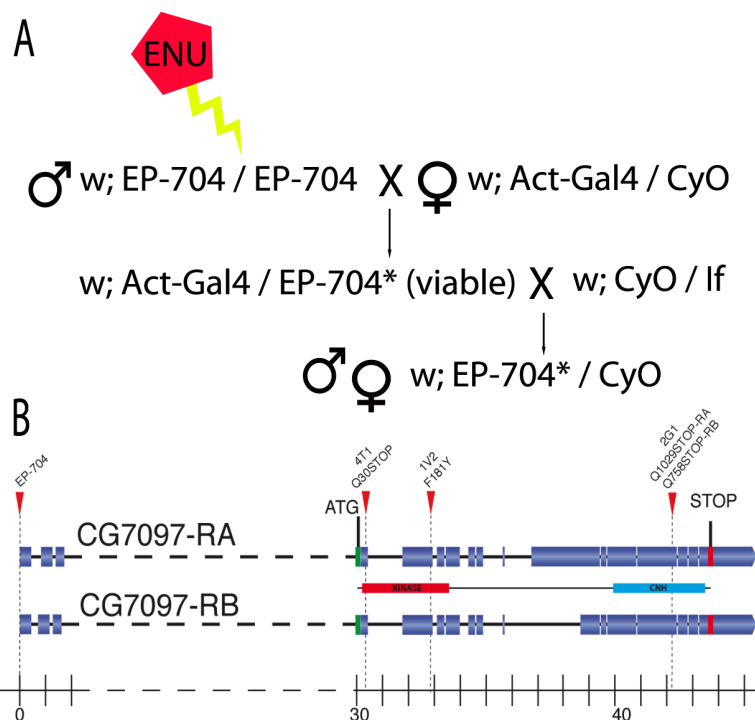


FIGURA R33: Mutagénesis química y localización de los mutantes generados en el gen *Map4k3*

A) Protocolo de cruces seguido durante la mutagénesis. El asterisco representa un cromosoma EP-704 con una mutación inducida en el gen *Map4k3* que revierte su fenotipo de sobre-expresión. **B)** Representación esquemática del gen *Map4k3* en la que se indica la posición de los cambios de nucleótido y sus efectos sobre la pauta de lectura asociados a cada mutante generado.

Se analizaron un total de 13.500 cromosomas *EP-704* mutagenizados y se encontraron tres revertientes, *EP-704^{1V2}*, *EP-704^{2G1}* y *EP-704^{4T1}*. Una vez establecidas líneas balanceadas de cada uno de estos revertientes, se extrajo el ADN genómico de cada uno de ellos y se realizaron diferentes PCRs con oligonucleótidos específicos para el gen *Map4k3*. Los productos resultantes se clonaron y se secuenciaron con el fin de encontrar las mutaciones producidas (ver Materiales y Métodos). Analizando las secuencias obtenidas se identificaron las diferentes mutaciones de los tres revertientes. En los revertientes *EP-704^{4T1}* y *EP-704^{2G1}* se produjeron cambios del aminoácido Gln por codones de parada en los exones 1 y 11 respectivamente, y en el revertiente *EP-704^{1V2}* se produjo una sustitución del aminoácido Phe por Tyr en el segundo exón (Fig. R33B).

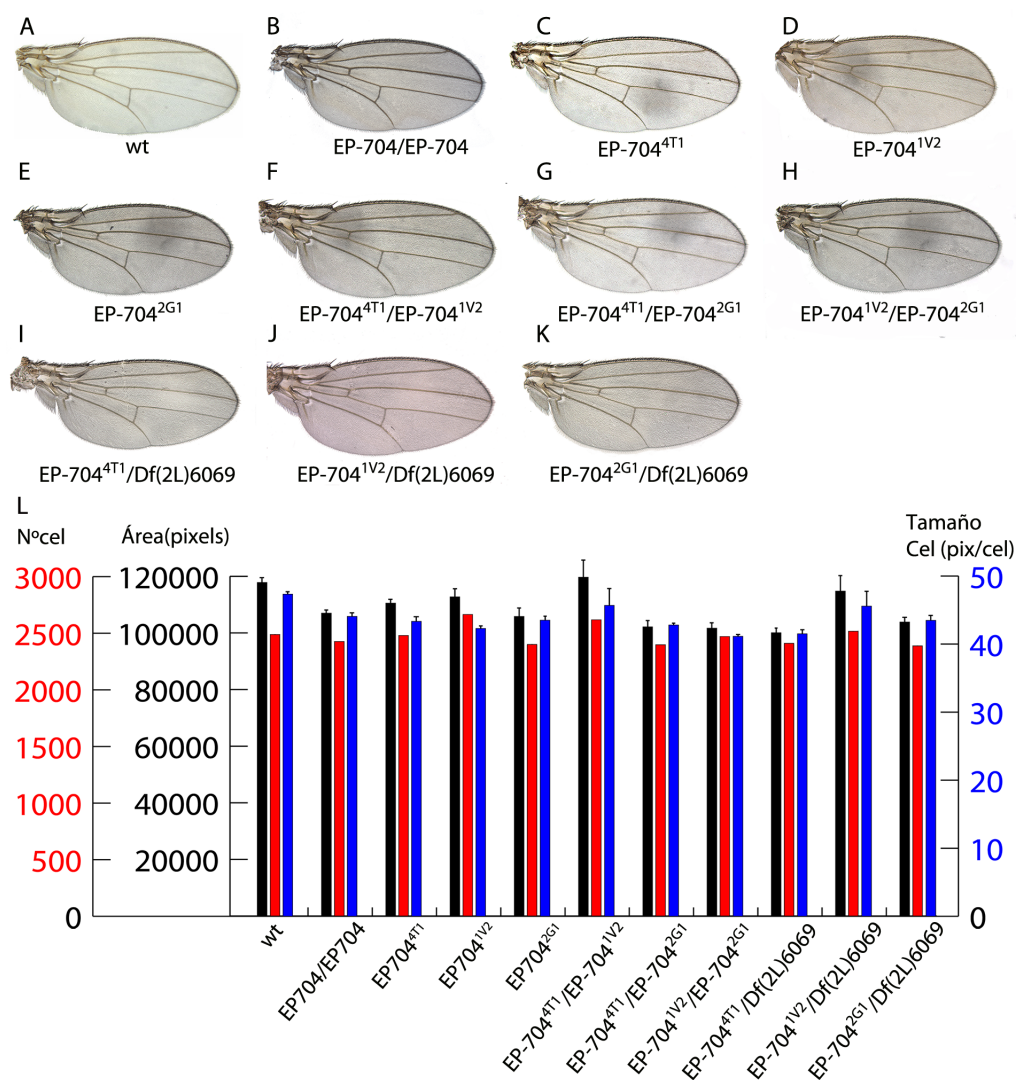


FIGURA R34: Fenotipos de los diferentes alelos de MAP4K3 y sus combinaciones

Los genotipos de cada combinación están anotados al pie de cada imagen. **A)** Ala silvestre (wt). **B-K)** Tanto los individuos homocigóticos para cada uno de los mutantes como las combinaciones trans-heterocigóticas entre ellos o con deficiencias de la región son viables. Los fenotipos de estas combinaciones son similares a los de la línea *EP-704* en homocigosis (B). **L)** Representación gráfica de los valores numéricos del tamaño del ala (negro), número de células (rojo), y tamaño de células (azul) de las diferentes combinaciones descritas en A-K.

	Área alas (píxeles)	t=	Número de células en región E dorsal	t=	n° Células total	Tamaño Células (pix/cel)
wt	117808 (+/-2792)		69 (+/-5)		2489	47,33 (+/-2)
EP704	106990 (+/-5899)	1,60E-04	74 (+/-3)	5,17E-02	2428	44,07 (+/-1,6)
EP704 ^{4T1}	110521 (+/-4578)	1,12E-02	73 (+/-3)	2,94E-03	2481	43,33 (+/-2,5)
EP704 ^{1V2}	112737 (+/-2835)	7,28E-05	77 (+/-3)	3,30E-02	2666	42,29 (+/-2,3)
EP704 ^{2G1}	105816 (+/-3218)	9,36E-06	74 (+/-3)	4,29E-03	2401	43,5 (+/-3,1)
EP704 ^{4T1} /EP704 ^{1V2}	119690 (+/-11093)	1,24E-04	71 (+/-3)	3,67E-06	2620	45,68 (+/-3,9)
EP704 ^{4T1} /EP704 ^{2G1}	102136 (+/-2314)	4,69E-04	76 (+/-2)	2,49E-03	2399	42,8 (+/-0,9)
EP704 ^{1V2} /EP704 ^{2G1}	101688 (+/-2564)	2,35E-02	79 (+/-4)	1,00E-01	2472	41,14 (+/-0,8)
EP704 ^{4T1} /Df(2L)6069	100075 (+/-2525)	2,67E-13	78 (+/-4)	1,99E-03	2411	41,51 (+/-1,8)
EP704 ^{1V2} /Df(2L)6069	107287 (+/-10518)	8,70E-02	71 (+/-1)	0,31	2518	45,58 (+/-3,8)
EP704 ^{2G1} /Df(2L)6069	103849 (+/-3491)	7,68E-09	75 (+/-3)	0,02	2389	43,48 (+/-2,3)

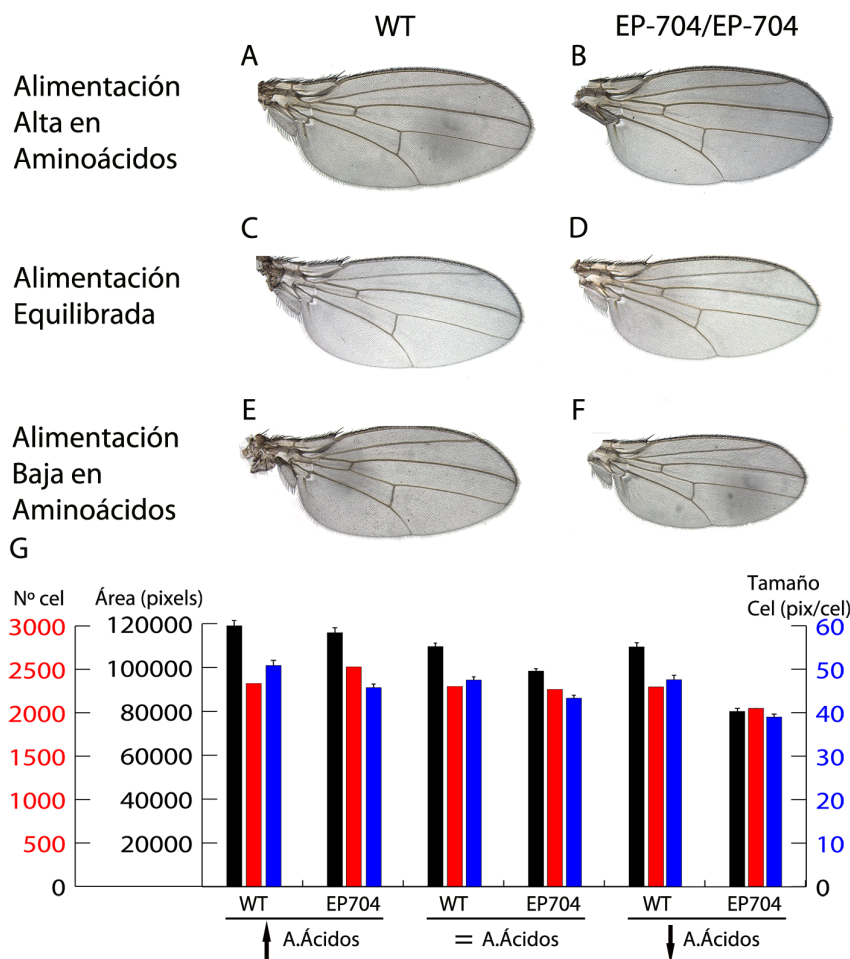
TABLA R13: Valores numéricos del tamaño de ala, número de células y tamaño celular de los fenotipos de los diferentes alelos de MAP4K3 y sus combinaciones.

Tanto los individuos homocigóticos para cada uno de los mutantes como sus combinaciones trans-heterocigóticas o con deficiencias de la región son viables. Los fenotipos de estas combinaciones son similares a los de la línea *EP-704* en homocigosis (Fig. R34, Gráfica R34L y Tabla R13). Los resultados del análisis de condiciones de falta de función indican un requerimiento de MAP4K3 en la ruta TOR, dado que se ve afectado el crecimiento celular y existe un retraso en la pupación. Estos resultados también indican que la función de MAP4K3 no es imprescindible para la activación de esta ruta en condiciones normales de desarrollo.

Una vez vistas las relaciones existentes entre MAP4K3 y las rutas JNK y TOR, y confirmado que los resultados del análisis de la falta de función no indica una función vital de la proteína durante el desarrollo normal del ala, analizamos si esta proteína podría tener alguna función en situaciones de estrés, tanto nutricional (TOR) como generalizado (JNK).

3.4.-Estudio de la falta de función en condiciones ambientales de estrés para JNK y TOR.

3.4a.-Condiciones de estrés nutricional.



La relación entre la vía de señalización TOR y MAP4K3 sugiere que el requerimiento del gen podría ser más relevante bajo situaciones nutricionales diferentes. Para analizar esta hipótesis, cultivamos tanto estirpes salvajes (WT) como individuos *EP-704* homocigóticos en medio de cultivo estándar, rico en proteínas y bajo en proteínas (ver Materiales y Métodos). Observamos que en medio rico en proteína el tamaño de las alas aumentaba tanto en moscas WT como en las mutantes comparado con el tamaño de alas de individuos crecidos en condiciones nutricionales normales (+9% WT y +5% *EP-704*) (Fig. R35A y B, Gráfica R35G y Tabla R14). En el mismo contexto nutricional, y al igual que las alas, tanto las moscas WT como las mutantes aumentan su masa corporal (+27% y +16% respectivamente, Tabla R15). Los dos resultados indican un rescate significativo del fenotipo de reducción de tamaño del ala y de la masa corporal en moscas mutantes homocigóticas para MAP4K3. Por el contrario, en situaciones de privación proteica, los dos genotipos ven reducido el tamaño del ala (-2% WT y -27% *EP-704*) y el peso (-2% WT y -20% *EP-704*) identificando un requerimiento mayor para MAP4K3 cuando la cantidad de aminoácidos del medio está reducida (Fig. R35E y F, Gráfica R35G, Tabla R14 y R15). Estos datos sugieren que MAP4K3 podría ser más necesario en situaciones de estrés para poder inducir altos niveles de actividad de TOR.

		Área alas (píxeles)	t=	Número de células en región E dorsal	t=	n° Células total	Tamaño Células (pix/cel)
+AA	wt	119024 (+/-2522)	2,64E-03	64 (+/-2)	4,47E-05	2340	50,86 (+/-2,3)
	EP704	115868 (+/-1778)		70 (+/-1)		2531	45,77 (+/-1,6)
=AA	wt	109550 (+/-1494)	2,33E-04	68 (+/-1)	7,97E-05	2306	47,51 (+/-2,3)
	EP704	98371 (+/-2392)		75 (+/-2)		2270	43,33 (+/-1,8)
-AA	wt	109404 (+/-2984)	2,00E-06	68 (+/-4)	2,33E-04	2299	47,59 (+/-2,5)
	EP704	79992 (+/-2757)		83 (+/-6)		2051	39 (+/-2,1)

TABLA R14: Valores numéricos del tamaño de ala, número de células y tamaño celular de los fenotipos de las alas obtenidas en diferentes condiciones nutricionales.

		peso (mg)	t=
+AA	wt	1,03 (+/-0,02)	1,23E-03
	EP704	0,944(+/-0,01)	
=AA	wt	0,81(+/-0,02)	3,21E-05
	EP704	0,77(+/-0,03)	
-AA	wt	0,79(+/-0,03)	4,21E-06
	EP704	0,66(+/-0,02)	

TABLA R15: Valores numéricos de la masa de moscas obtenidas en diferentes condiciones nutricionales.

3.4b.-Condiciones de estrés generalizado.

Cuando inducimos estrés a las células imaginales mediante radiaciones ionizantes, daños mecánicos en el tejido o temperaturas extremas se observa como respuesta la activación de la ruta JNK. Así, tras una exposición a rayos X (1500R), se observa un aumento de los niveles de *puc* indicativo de un aumento de los niveles de actividad JNK (Fig. R36A-B). Cuando reducimos los niveles de MAP4K3 en el compartimiento posterior de los discos imaginales de ala en un contexto de estrés por radiación iónica, observamos que se produce una reducción de los niveles de activación de la ruta JNK de manera autónoma en el compartimiento posterior (Fig. R36A-B y C). Estos datos sugieren que MAP4K3 podría ser necesaria en situaciones de estrés para poder inducir altos niveles de actividad de JNK.

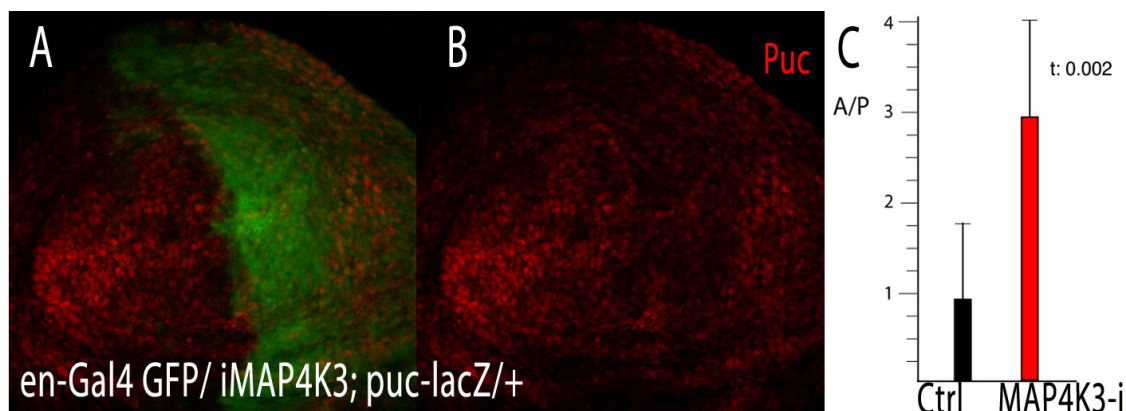


FIGURA R36: La reducción en los niveles de MAP4K3 disminuye la activación de la ruta JNK en discos irradiados

A-B) La expresión de *puc-LacZ* (rojo) en discos *en-Gal4 UAS-GFP/UAS-MAP4K3-i; puc-lacZ/+* de tercer estadio larvario 8 horas después de ser irradiados desciende en el compartimento posterior (GFP en verde). **C)** Representación gráfica de la razón de la intensidad de señal en el canal rojo (expresión de *puc-LacZ*) entre el compartimento anterior y el posterior de discos control *en-Gal4 UAS-GFP/+; puc-LacZ/+* (barra negra), y discos experimento *en-Gal4 UAS-GFP/UAS-MAP4K3-i; puc-lacZ/+* (barra roja). Los niveles de señal en el canal rojo son menores en el compartimento posterior de los discos *en-Gal4 UAS-GFP/UAS-MAP4K3-i; puc-lacZ/+*.

En resumen, la falta de función de MAP4K3 causa defectos en la activación de las rutas JNK y TOR. Estos requerimientos se manifiestan de manera muy significativa cuando enfrentamos a las células a diferentes condiciones de estrés, lo que sugiere que MAP4K3 es necesaria para conseguir niveles máximos de actividad de las rutas TOR y JNK en situaciones de estrés.

V. DISCUSIÓN

El tamaño final de un órgano está determinado por el número de células que lo componen y por el tamaño de estas. A su vez, el número de células depende del balance entre la proliferación y la muerte celular. Como sistema modelo para estudiar el control genético del tamaño hemos elegido el ala de *Drosophila melanogaster*. El tamaño de este tejido puede afectarse, sin modificar el patrón de diferenciación, por las rutas de señalización InR/TOR y JNK. Utilizando las ventajas que nos proporciona *Drosophila*, hemos identificado al gen *happyhour*, estudiado las consecuencias fenotípicas de cambiar sus niveles de expresión y establecido su relación funcional con estas vías de señalización. En estudios anteriores se había sugerido que la proteína MAP4K3, codificada por *happyhour*, podría estar implicada en la actividad de las rutas EGFR (Corl et al., 2009), JNK (Lam et al., 2009), TOR (Bryk et al. 2010; Findlay et al., 2007) e ImD (Kallio et al., 2005).

1.-IDENTIFICACIÓN DEL GEN *CG7097/HAPPYHOUR* COMO RESPONSABLE DEL FENOTIPO DE SOBRE-EXPRESIÓN DE LA LÍNEA *EP-704*

Al combinar la línea *EP-704*, insertada en la región 5' UTR del gen *CG7097*, con distintas líneas Gal4 con expresión restringida al ala, el efecto producido es siempre una reducción del tamaño de la región del ala correspondiente al dominio de expresión de la

línea Gal4 utilizada. Sólo en las condiciones más fuertes de sobre-expresión observamos pequeñas alteraciones en el patrón de venas consistentes en la aparición de extravenas en las regiones medio-distales del ala. Identificamos el gen *CG7097* como el responsable del fenotipo de sobre-expresión de estas combinaciones siguiendo varios criterios. En primer lugar confirmamos mediante hibridaciones *in situ* realizadas en discos *sal^{EPv}-Gal4/EP-704* con una sonda antisentido del gen *CG7097* su expresión ectópica en el dominio de expresión de la línea Gal4. En segundo lugar, observamos que combinaciones de líneas Gal4 con una construcción *UAS-CG7097* también causan un fenotipo de reducción del tamaño del ala, que es idéntico al de los correspondientes individuos *Gal4/EP-704*. Finalmente, se determinó que la introducción de la línea UAS-ARNi de *CG7097* suprime el fenotipo de sobre-expresión de la línea EP-704.

El gen *CG7097* se encuentra en el brazo cromosómico 2R y tiene 2 isoformas (llamadas A y B) que difieren según la utilización o no de parte del exón 8 en 813 pb. Al analizar su secuencia encontramos que las dos isoformas tienen dos dominios conservados, un dominio Ser/Thr quinasa en la región N-Terminal, y un dominio CNH (Citron Homology Domain) en la región C-Terminal. Estos dominios indican que *CG7097* pertenece al grupo de proteínas Sterile 20 quinasas de levaduras, las cuales están muy conservadas a lo largo de la evolución. El grupo Ste20 quinasas se divide en 2 familias: p21-Activated Kinases (PAK) y Germinal Center Kinases (GCK). *CG7097* tiene una homología mayor con la subfamilia GCK-I (Germinal Center Kinase-I, proteína también conocida como MAP4K3) (Dan et al., 2001). La subfamilia GCK-I, además de los ya citados dominios, tiene una región intermedia muy variable con motivos ricos en prolinas, y suele funcionar como una proteína de andamiaje para permitir la unión entre varias quinasas. Las proteínas MAP4K3 también presentan una alta afinidad por GTPasas pequeñas.

2.-LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA MAP4K3

La expresión del gen *CG7097* es generalizada en todos los discos imaginales. Como es de esperar, la proteína MAP4K3 también se expresa en todas las células imaginales, localizándose en el citoplasma. Cuando sobre-expresamos MAP4K3 en el disco imaginal de ala observamos que la proteína se detecta mayoritariamente en el citoplasma, aunque también se detecta expresión en el núcleo. Para identificar la participación de los dominios quinasa y CNH en la función de MAP4K3 realizamos experimentos de sobre-expresión de proteínas truncadas. En el caso del dominio CNH (*UAS-MAP4K3-ΔK*) encontramos que su sobre-

expresión no causa ningún fenotipo, y que su localización subcelular es nuclear. Por contra, la sobre-expresión del dominio quinasa (*UAS-MAP4K3-ΔCNH*), causa una reducción del tamaño del ala incluso mayor que la expresión ectópica de la proteína completa. La localización subcelular del dominio quinasa en condiciones de sobre-expresión es mayoritariamente citoplasmática. Estos resultados sugieren que el dominio quinasa es fundamental para producir el fenotipo de reducción del tamaño del ala. El dominio CNH podría funcionar como un regulador de la actividad de la proteína, ya que el dominio quinasa parece ser más activo cuando está separado del dominio CNH. Esta regulación mediada por el dominio CNH podría estar basada en su participación en modificar la localización subcelular de la proteína, ya que cuando los dominios quinasa y CNH se sobre-expresan por separado, su localización es distinta a cuando se sobre-expresa la proteína completa. En trabajos que se realizaron de manera paralela a esta tesis en células U2OS de mamíferos (Lam et al., 2009), se propuso que el dominio CNH participa en la regulación de los niveles de proteína.

3.-FUNCIONES INDEPENDIENTES DE MAP4K3 EN LAS RUTAS TOR Y JNK

El aumento en los niveles de expresión de MAP4K3 en el ala causa un importante fenotipo de reducción de tamaño en la misma, debido a una reducción tanto del número como del tamaño de las células. La sobre-expresión de la proteína también produce un incremento de la apoptosis debido a un aumento en la actividad de JNK. Como consecuencia de esta muerte celular, se induce un aumento de la proliferación celular debido a un efecto descrito como proliferación compensatoria (Huh et al., 2004; Perez-Garijo et al., 2004). Por otro lado, observamos en el cuerpo graso, el equivalente al hígado de los mamíferos, que la expresión aumentada de MAP4K3 causa un fenotipo de fusión de vesículas lipídicas. Este fenotipo es indicativo de una reducción de la actividad de la vía TOR, implicada en la detección de los niveles de aminoácidos. El conjunto de los fenotipos observados tras la sobre-expresión de MAP4K3 sugiere que en estas condiciones se produce tanto una activación de la vía JNK como una reducción de la ruta de señalización TOR.

Estos dos efectos parecen deberse a funciones independientes de la proteína MAP4K3 en las vías de señalización TOR y JNK. De esta manera, el descenso de la actividad de TOR inducido al reducir directamente los niveles de expresión de cualquiera de sus miembros no causa muerte celular de manera generalizada, como es el caso del aumento de los niveles de MAP4K3. De forma complementaria, variaciones en la actividad JNK no

producen cambios en el tamaño celular, un fenotipo característico del aumento de MAP4K3. Es de destacar que la reducción del tamaño del ala causada por la sobre-expresión de MAP4K3 no se debe a la inducción masiva de muerte celular observada, ya que cuando se inhibe la muerte celular en discos donde se sobre-expresa MAP4K3 no se recupera el tamaño normal del ala. Por el contrario en alguna de estas combinaciones observamos una reducción del tamaño del ala incluso mayor que la producida por MAP4K3 en presencia de muerte celular. Este efecto es principalmente debido a una disminución mayor del tamaño de las células y no de su número. Que no varíe el número de células se debería al efecto de la proliferación compensatoria, ya que cuando hay apoptosis observamos un aumento del índice mitótico. Por otra parte, la disminución del tamaño celular cuando se inhibe la apoptosis podría ser debida a que las células al no morir mantienen durante más tiempo una bajada de los niveles de actividad de TOR.

En conclusión, nuestros datos sugieren que las funciones de MAP4K3 en las vías TOR y JNK son independientes entre sí, y posiblemente reflejen que MAP4K3 participa en al menos dos complejos proteicos de señalización. A continuación discutimos estos dos aspectos de la función de MAP4K3 de manera independiente

4.-RELACIÓN DE LA GANANCIA Y LA FALTA DE FUNCIÓN DE MAP4K3 CON LA RUTA TOR

El análisis de los efectos causados por la reducción de la expresión de MAP4K3, inducida por expresión de un ARNi o utilizando los diferentes alelos de falta de función disponibles, no indica ningún requerimiento crítico del gen durante el desarrollo embrionario y larvario. Los diferentes alelos utilizados causan desde una reducción del 85% en los niveles del ARNm a la falta de la proteína debido a la generación de un codón de terminación en el primer exón, y por tanto la falta de un requerimiento del gen para la viabilidad no parece ser debida a los remanentes de función presentes en estos fondos mutantes. A pesar de no ser requerido para la viabilidad celular, la falta de función de MAP4K3 causa un fenotipo débil de reducción del tamaño del ala debido a una disminución del tamaño de las células. En estos mutantes también se observa un retraso de 2 días en el desarrollo, tanto este fenotipo como la reducción en el tamaño celular son compatibles con una disminución moderada de la actividad TORC1.

El aumento en los niveles de expresión de MAP4K3 también causa fenotipos compatibles con un descenso en la actividad de TOR, fundamentalmente la reducción del ta-

maño del ala, debida a una disminución del número y del tamaño de las células, y la fusión de las vesículas lipídicas en el cuerpo graso. En la misma dirección, el fenotipo de sobre-expresión de MAP4K3 es muy sensible a los cambios producidos en los niveles o actividad de varios miembros de la ruta InR/TOR. De este modo, cuando aumentamos los niveles de MAP4K3 se observan interacciones sinérgicas en combinaciones donde reducimos la actividad de diferentes miembros de la ruta InR/TOR como son Akt, Raptor o TOR. De manera inversa, y aunque la disminución de los niveles de MAP4K3 no tenga efectos en el ala, sí produce un rescate de su tamaño cuando se expresa en presencia de TOR^{TED} (versión dominante negativa de Tor). De esta forma, concluimos que tanto los mutantes de falta de función como la sobre-expresión de MAP4K3 producen un descenso de la actividad de la ruta TOR.

El complejo TORC1, cuando se activa por la recepción de aminoácidos, está formado entre otros por las proteínas RagA, RagC, Raptor y TOR. Cuando se sobre-expresan versiones normales tanto de RagA como de TOR se produce un fenotipo de reducción del tamaño del ala. Estos efectos se han interpretado como consecuencia de la formación de complejos inactivos que reducen la actividad de la vía (Henning y Neufeld, 2002). Lo mismo podría ocurrir cuando expresamos de manera ectópica MAP4K3, si esta proteína formara parte del complejo TORC1. De esta manera, parece que debe existir una relación adecuada entre las cantidades de MAP4K3 y las de otros componentes del complejo Tor, que se rompería al sobre-expresar los niveles relativos de estas proteínas, resultando en la formación de complejos inactivos con efectos dominante-negativo. En experimentos de pull-down in vitro hemos visto que MAP4K3 interacciona con las GTPasas RagA, RagC y con la quinasa TOR. Estos resultados concuerdan con los hallados en inmunoprecipitaciones llevadas a cabo en células S2 de *Drosophila* (Bryk et al. 2010). El mecanismo por el que un exceso de MAP4K3 podría alterar la estequiometría de los complejos TORC1 podría ser debido tanto a una posible función de andamiaje de MAP4K3 como a una alteración en los niveles de fosforilación de los componentes del complejo TORC1. En ambos casos, el exceso de MAP4K3 llevaría a la formación de complejos no funcionales y por tanto a la generación de fenotipos de falta de función.

La interacción detectada entre MAP4K3 y diferentes miembros del complejo TORC1 también sugiere que MAP4K3 actúa a nivel de este complejo. Esta hipótesis también se ve reforzada por los resultados de las combinaciones genéticas entre MAP4K3 y los componentes de la ruta InR/TOR. Así, la sobre-expresión de MAP4K3 suprime el aumento de tamaño producido por una reducción de los niveles de Pten y Tsc1-2, y también los fenotipos causados por la expresión de una versión activada de Akt. Finalmente, MAP4K3 se

sitúa genéticamente por debajo de *RagA* y por encima de *dS6K*, ya que su fenotipo se rescata parcialmente en combinación con una versión activada de *dS6K*. Nuestros resultados, por tanto indican que MAP4K3 es necesaria para generar máximos niveles de señalización TOR, lo que es compatible con otros resultados publicados recientemente tanto en cultivos de células humanas como en *Drosophila* (Bryk et al., 2010; Findlay et al., 2007).

5.-RELACIÓN DE LA GANANCIA Y LA FALTA DE FUNCIÓN DE MAP4K3 CON LA RUTA JNK

La expresión aumentada en el ala de MAP4K3 produce de manera autónoma un incremento de la muerte celular, acompañado por la inducción de la expresión del gen *puc*. Estos efectos son diagnósticos de la activación de la ruta JNK, lo que indica que los niveles altos de MAP4K3 inducen la activación de esta vía. Por otra parte, la falta de función de la ruta JNK no produce ningún fenotipo en el ala, como tampoco ocurre cuando reducimos los niveles de MAP4K3. El análisis de combinaciones genéticas entre diferentes miembros de la ruta JNK y MAP4K3 nos ha permitido concluir que MAP4K3 se sitúa entre *dTraf1* y *Msn*, aunque aún es necesario un análisis más exhaustivo de estas interacciones, ya que en *Drosophila* los mecanismos de funcionamiento de esta ruta por encima de las proteínas JNKKK (*dTAK1*, *dASK1*, *Slpr*, *dMekk1*) no están bien caracterizados. Dado que la ruta JNK sólo se activa en el epitelio del ala en situaciones de estrés y que la proteína MAP4K3 se expresa en el citoplasma de todas las células del ala de manera homogénea, nos preguntamos si su función es necesaria en situaciones de estrés para activar la ruta JNK.

6.-PAPEL DE MAP4K3 BAJO SITUACIONES DE ESTRÉS

Al someter a las células a un estrés por irradiación, vimos que la activación de JNK producida es menor en la región del disco imaginal donde reducimos la expresión de MAP4K3. De esta forma, y al contrario de lo observado en el caso de TOR, MAP4K3 tiene efectos opuestos en condiciones de falta y exceso de expresión con respecto a la ruta JNK. Estos resultados sugieren que el papel *in vivo* que tiene la proteína MAP4K3 podría ser importante para la plena activación de la ruta JNK como respuesta a un daño producido en las células. Este comportamiento sería similar al observado en células S2, donde la reducción de MAP4K3 disminuye la actividad de IMD, que se activa por JNK, un 50% tras infección

por *E.coli* (Kallio et al., 2005).

Como acabamos de ver, la proteína MAP4K3 parece tener un papel fisiológico en la señalización de la ruta JNK bajo situaciones de estrés, pero el comportamiento que tiene la proteína cuando sus niveles de expresión se aumentan es contrario para las rutas JNK y TOR. Así, en el caso de la vía de señalización JNK se observa su activación cuando MAP4K3 es sobre-expresada y la pérdida de su actividad cuando reducimos los niveles de MAP4K3. En cambio, la actividad de TOR desciende tanto en condiciones de sobre-expresión como de falta de función de MAP4K3. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos al irradiar las células, nos preguntamos si sometiénolas a un estrés nutricional encontraríamos un requerimiento parecido de MAP4K3 en la ruta TOR. Este resultado pondría de manifiesto la necesidad de que esta proteína se exprese a niveles apropiados en todas las células para poder responder a distintas situaciones de estrés. Sabiendo que MAP4K3 está relacionada con la función de TOR en la detección de los niveles de aminoácidos, decidimos variar tanto por exceso como por defecto la cantidad de éstos en el medio. Observamos que en presencia de una dieta rica en proteínas se rescata el fenotipo de reducción de tamaño y peso de las moscas mutantes para MAP4K3, adquiriendo valores parecidos a los de las moscas WT. De esta forma, el exceso de proteínas no supone un estrés para las células y la sobre-activación de la vía por un aumento de los niveles de aminoácidos consigue paliar en parte el descenso producido por una falta de MAP4K3. Por el contrario, en situaciones de privación proteica, los fenotipos de reducción de tamaño del ala y del peso corporal son mayores que los observados en moscas WT, sugiriendo un requerimiento funcional de MAP4K3 en condiciones de falta de proteínas en la dieta. Se ha publicado recientemente que la privación de aminoácidos en moscas WT y mutantes para MAP4K3 produce el mismo retraso en el desarrollo, sugiriendo que MAP4K3 sólo se requiere *in vivo* para activar máximos niveles de TOR y promover un mayor crecimiento cuando los niveles de aminoácidos son altos (Bryk et al. 2010). Pensamos que la diferencia entre estos resultados y los nuestros podría deberse por un lado a los parámetros medidos, tiempo de desarrollo frente a tamaño de ala, número y tamaño de células y por otro lado a la actividad residual de MAP4K3 en los diferentes mutantes utilizados.

En conclusión, aunque los mecanismos de funcionamiento de la proteína MAP4K3 son independientes en las rutas JNK y TOR, hemos visto que la proteína MAP4K3 se requiere fundamentalmente bajo ciertas condiciones de estrés a las que responden ambas rutas. Es posible que estas funciones sean importantes cuando poblaciones celulares sufren daños que podrían llevarlas a comportamientos malignos, lo que explicaría la asociación entre algunos tipos de cánceres de páncreas y mutaciones en el gen *MAP4K3* (Jones et al.,

2008). Dada la naturaleza molecular de esta proteína, sus interacciones con las diferentes rutas de señalización en las que participa ocurren a nivel de las GTPasas pequeñas. Como hemos visto, esto ocurre en la ruta TOR, y también podría ser el caso de la ruta JNK, donde las GTPasas pequeñas Rho1, Rac1 y Cdc42 están implicadas en activar la ruta JNK en respuesta a estrés celular (Baek et al.; Neisch et al.; Teramoto et al., 1996b) y podrían hacerlo a través de MAP4K3.

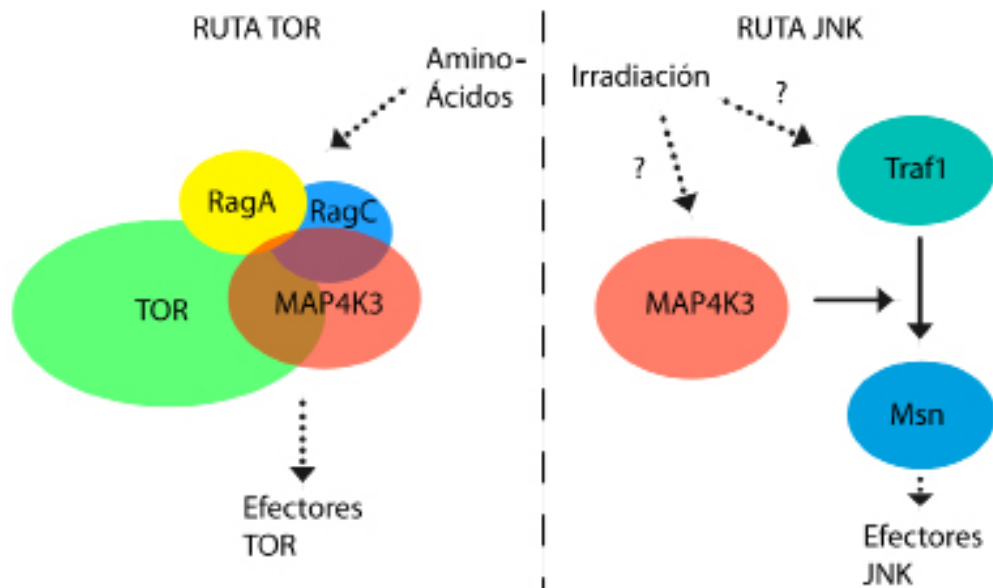


Figura D1: Esquema de la participación de MAP4K3 en las rutas de señalización TOR y JNK



VI. CONCLUSIONES

- 1) Las combinaciones genéticas entre la inserción EP-704 y líneas Gal4 de expresión en el ala causan un fenotipo de reducción del tamaño del ala debido a una disminución del número y del tamaño de las células. En estas combinaciones observamos también la presencia de células apoptóticas en los discos imaginales correspondientes. En el cuerpo graso, produce un fenotipo de fusión de vesículas lipídicas característico de una bajada en la actividad de la ruta de señalización TOR
- 2) El gen responsable por sobre-expresión de los fenotipos de reducción de tamaño del ala y de fusión de vesículas lipídicas en el cuerpo graso es *CG7097/happyhour*.
- 3) *happyhour* codifica la proteína MAP4K3, que pertenece a la familia de quinasas Sterile20 y presenta un dominio CNH (Citron Homology Domain) N-terminal y un dominio Ser/Thr quinasa C-terminal. La proteína MAP4K3 se expresa de manera generalizada en el citoplasma de las células de los discos imaginales. El dominio quinasa es fundamental para producir la reducción del tamaño del ala, y el dominio CNH podría funcionar como un regulador de la actividad de la proteína.
- 4) La sobre-expresión de MAP4K3 no produce ninguna alteración en el ciclo celular.
- 5) La sobre-expresión de MAP4K3 tiene dos efectos independientes: la inducción de apoptosis debido al incremento de la actividad de la ruta de señalización JNK y la reducción del crecimiento y división celular debido a una disminución de la actividad de la ruta TOR.
- 6) Las combinaciones genéticas entre MAP4K3 y diferentes componentes de la ruta de señalización InR/TOR sugieren que su función se sitúa entre los genes Rags y TOR.

- 7) En ensayos de pull-down se detectan interacciones directas entre las proteínas MAP4K3 y las proteínas TOR, RagA y RagC, lo que sugiere que MAP4K3 podría formar parte del complejo TORC1.
- 8) Las combinaciones genéticas entre MAP4K3 y diferentes componentes de la ruta de señalización JNK indican que la función de MAP4K3 en la ruta JNK se sitúa entre los genes dTraf1 y Msn.
- 9) La falta de función de MAP4K3 produce un retraso en el desarrollo larvario pero no afecta a la viabilidad celular ni del organismo.
- 10) La falta de función de MAP4K3 causa defectos en la activación de las rutas JNK y TOR que se manifiestan de manera más significativa cuando las células se enfrentan a diferentes condiciones de estrés. Sugerimos que MAP4K3 es necesaria para conseguir niveles máximos de actividad de las rutas TOR y JNK en situaciones de estrés.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi-Yamada, T. y O'Connor, M. B. (2002). Morphogenetic apoptosis: a mechanism for correcting discontinuities in morphogen gradients. *Dev Biol* 251, 74-90.
- Adams, J. M. y Cory, S. (2002). Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 14, 715-20.
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F. et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-95.
- Alessi, D. R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F. B., Morrice, N., Norman, D. G., Gaffney, P., Reese, C. B., MacDougall, C. N., Harbison, D. et al. (1997). 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural y functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr Biol* 7, 776-89.
- Arquier, N., Geminard, C., Bourouis, M., Jarretou, G., Honegger, B., Paix, A. y Leopold, P. (2008). *Drosophila* ALS regulates growth y metabolism through functional interaction with insulin-like peptides. *Cell Metab* 7, 333-8.
- Arya, R. y Lakhotia, S. C. (2008). Hsp60D is essential for caspase-mediated induced apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress Chaperones* 13, 509-26.
- Arya, R., Mallik, M. y Lakhotia, S. C. (2007). Heat shock genes - integrating cell survival y death. *J Biosci* 32, 595-610.
- Ashburner, M. (1989). *Drosophila: A laboratory handbook*. Cold spring harbor laboratory press.
- Baek, S. H., Kwon, Y. C., Lee, H. y Choe, K. M. Rho-family small GTPases are required for cell

- polarization and directional sensing in *Drosophila* wound healing. *Biochem Biophys Res Commun* 394, 488-92.
- Bai, X., Ma, D., Liu, A., Shen, X., Wang, Q. J., Liu, Y. y Jiang, Y. (2007). Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38. *Science* 318, 977-80.
- Basler, K. y Struhl, G. (1994). Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein. *Nature* 368, 208-14.
- Bate, M. y Arias, A. M. (1991). The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*. *Development* 112, 755-61.
- Baum, J. S., Arama, E., Steller, H. y McCall, K. (2007). The *Drosophila* caspases Strica and Dronc function redundantly in programmed cell death during oogenesis. *Cell Death Differ* 14, 1508-17.
- Blair, S. S. (1995). Compartments and appendage development in *Drosophila*. *Bioessays* 17, 299-309.
- Bohni, R., Riesgo-Escovar, J., Oldham, S., Brogiolo, W., Stocker, H., Andruss, B. F., Beckingham, K. y Hafen, E. (1999). Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell* 97, 865-75.
- Bosch, M., Serras, F., Martin-Blanco, E. y Baguna, J. (2005). JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs. *Dev Biol* 280, 73-86.
- Boutros, M., Agaisse, H. y Perrimon, N. (2002). Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Dev Cell* 3, 711-22.
- Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D. I. y Mlodzik, M. (1998). Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* 94, 109-18.
- Bradley, G. L. y Leever, S. J. (2003). Amino acids and the humoral regulation of growth: fat bodies use slimfast. *Cell* 114, 656-8.
- Brand, A. H. y Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-15.
- Brodsky, M. H., Weinert, B. T., Tsang, G., Rong, Y. S., McGinnis, N. M., Golic, K. G., Rio, D. C. y Rubin, G. M. (2004). *Drosophila melanogaster* MNK/Chk2 and p53 regulate multiple DNA repair and apoptotic pathways following DNA damage. *Mol Cell Biol* 24, 1219-31.
- Brogiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R. y Hafen, E. (2001). An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr Biol* 11, 213-21.
- Brumby, A. M. y Richardson, H. E. (2003). scribble mutants cooperate with oncogenic Ras or Notch to cause neoplastic overgrowth in *Drosophila*. *Embo J* 22, 5769-79.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K.

- C., Blenis, J. y Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-68.
- Bryk, B., Hahn, K., Cohen, S. M. y Teleman, A. A. MAP4K3 regulates body size and metabolism in *Drosophila*. *Dev Biol* 344, 150-7.
- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. y Morata, G. (1996). Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* 274, 252-5.
- Castle, W. E. (1906). Inbreeding, Cross-Breeding and Sterility in *Drosophila*. *Science* 23, 153.
- Cha, G. H., Cho, K. S., Lee, J. H., Kim, M., Kim, E., Park, J., Lee, S. B. y Chung, J. (2003). Discrete functions of TRAF1 and TRAF2 in *Drosophila melanogaster* mediated by c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB-dependent signaling pathways. *Mol Cell Biol* 23, 7982-91.
- Chen, P., Nordstrom, W., Gish, B. y Abrams, J. M. (1996). grim, a novel cell death gene in *Drosophila*. *Genes Dev* 10, 1773-82.
- Chen, W., White, M. A. y Cobb, M. H. (2002). Stimulus-specific requirements for MAP3 kinases in activating the JNK pathway. *J Biol Chem* 277, 49105-10.
- Clements, J., Hens, K., Francis, C., Schellens, A. y Callaerts, P. (2008). Conserved role for the *Drosophila* Pax6 homolog Eyeless in differentiation and function of insulin-producing neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16183-8.
- Cohen, B., Simcox, A. A. y Cohen, S. M. (1993). Allocation of the thoracic imaginal primordia in the *Drosophila* embryo. *Development* 117, 597-608.
- Colin, J., Gaumer, S., Guenal, I. y Mignotte, B. (2009). Mitochondria, Bcl-2 family proteins and apoptosomes: of worms, flies and men. *Front Biosci* 14, 4127-37.
- Colombani, J., Raisin, S., Pantalacci, S., Radimerski, T., Montagne, J. y Leopold, P. (2003). A nutrient sensor mechanism controls *Drosophila* growth. *Cell* 114, 739-49.
- Corl, A. B., Berger, K. H., Ophir-Shohat, G., Gesch, J., Simms, J. A., Bartlett, S. E. y Heberlein, U. (2009). Happyhour, a Ste20 family kinase, implicates EGFR signaling in ethanol-induced behaviors. *Cell* 137, 949-60.
- Crick, F. H. y Lawrence, P. A. (1975). Compartments and polyclones in insect development. *Science* 189, 340-7.
- Cruz, C., Glavic, A., Casado, M. y de Celis, J. F. (2009). A gain-of-function screen identifying genes required for growth and pattern formation of the *Drosophila melanogaster* wing. *Genetics* 183, 1005-26.
- Dan, I., Watanabe, N. M. y Kusumi, A. (2001). The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol* 11, 220-30.
- De Celis, J. F. (2003). Pattern formation in the *Drosophila* wing: The development of the veins. *Bioessays* 25, 443-51.

- de Celis, J. F., Garcia-Bellido, A. y Bray, S. J. (1996). Activation and function of Notch at the dorsal-ventral boundary of the wing imaginal disc. *Development* 122, 359-69.
- Delaney, J. R., Stoven, S., Uvell, H., Anderson, K. V., Engstrom, Y. y Mlodzik, M. (2006). Cooperative control of *Drosophila* immune responses by the JNK and NF-kappaB signaling pathways. *Embo J* 25, 3068-77.
- Diaz-Benjumea, F. J. y Cohen, S. M. (1993). Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell* 75, 741-52.
- Diaz-Benjumea, F. J. y Cohen, S. M. (1995). Serrate signals through Notch to establish a Wingless-dependent organizer at the dorsal/ventral compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Development* 121, 4215-25.
- Dorstyn, L., Colussi, P. A., Quinn, L. M., Richardson, H. y Kumar, S. (1999). DRONC, an ecdysone-inducible *Drosophila* caspase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4307-12.
- Doumanis, J., Quinn, L., Richardson, H. y Kumar, S. (2001). STRICA, a novel *Drosophila* melanogaster caspase with an unusual serine/threonine-rich prodomain, interacts with DIAP1 and DIAP2. *Cell Death Differ* 8, 387-94.
- Duffy, J. B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34, 1-15.
- Engelman, J. A., Luo, J. y Cantley, L. C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 7, 606-19.
- Findlay, G. M., Yan, L., Procter, J., Mieulet, V. y Lamb, R. F. (2007). A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signalling. *Biochem J* 403, 13-20.
- Fraser, A. G., McCarthy, N. J. y Evan, G. I. (1997). drICE is an essential caspase required for apoptotic activity in *Drosophila* cells. *Embo J* 16, 6192-9.
- Fristrom, D. (1976). The mechanism of evagination of imaginal discs of *Drosophila* melanogaster. III. Evidence for cell rearrangement. *Dev Biol* 54, 163-71.
- Fristrom, D., Wilcox, M. y Fristrom, J. (1993). The distribution of PS integrins, laminin A and F-actin during key stages in *Drosophila* wing development. *Development* 117, 509-23.
- Galko, M. J. y Krasnow, M. A. (2004). Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae. *PLoS Biol* 2, E239.
- Gao, X., Neufeld, T. P. y Pan, D. (2000). *Drosophila* PTEN regulates cell growth and proliferation through PI3K-dependent and -independent pathways. *Dev Biol* 221, 404-18.
- Garcia-Bellido, A. y Merriam, J. R. (1971). Clonal parameters of tergite development in *Drosophila*. *Dev Biol* 26, 264-76.
- Garcia-Bellido, A., Ripoll, P. y Morata, G. (1973). Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. *Nat New Biol* 245, 251-3.

- Gershman, B., Puig, O., Hang, L., Peitzsch, R. M., Tatar, M. y Garofalo, R. S. (2007). High-resolution dynamics of the transcriptional response to nutrition in *Drosophila*: a key role for dFOXO. *Physiol Genomics* 29, 24-34.
- Geuking, P., Narasimamurthy, R. y Basler, K. (2005). A genetic screen targeting the tumor necrosis factor/Eiger signaling pathway: identification of *Drosophila* TAB2 as a functionally conserved component. *Genetics* 171, 1683-94.
- Glise, B., Bourbon, H. y Noselli, S. (1995). hemipterous encodes a novel *Drosophila* MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. *Cell* 83, 451-61.
- Goberdhan, D. C., Meredith, D., Boyd, C. A. y Wilson, C. (2005). PAT-related amino acid transporters regulate growth via a novel mechanism that does not require bulk transport of amino acids. *Development* 132, 2365-75.
- Goberdhan, D. C., Paricio, N., Goodman, E. C., Mlodzik, M. y Wilson, C. (1999). *Drosophila* tumor suppressor PTEN controls cell size and number by antagonizing the Chico/PI3-kinase signaling pathway. *Genes Dev* 13, 3244-58.
- Goberdhan, D. C. y Wilson, C. (2003). The functions of insulin signaling: size isn't everything, even in *Drosophila*. *Differentiation* 71, 375-97.
- Goto, S. y Hayashi, S. (1997). Specification of the embryonic limb primordium by graded activity of Decapentaplegic. *Development* 124, 125-32.
- Goyal, L., McCall, K., Agapite, J., Hartwig, E. y Steller, H. (2000). Induction of apoptosis by *Drosophila* reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. *Embo J* 19, 589-97.
- Grether, M. E., Abrams, J. M., Agapite, J., White, K. y Steller, H. (1995). The head involution defective gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death. *Genes Dev* 9, 1694-708.
- Grewal, S. S., Evans, J. R. y Edgar, B. A. (2007). *Drosophila* TIF-IA is required for ribosome synthesis and cell growth and is regulated by the TOR pathway. *J Cell Biol* 179, 1105-13.
- Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E. y Shaw, R. J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30, 214-26.
- Hannan, K. M., Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G. A., Pearson, R. B. et al. (2003). mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Mol Cell Biol* 23, 8862-77.
- Hardie, D. G. (2008). AMPK and Raptor: matching cell growth to energy supply. *Mol Cell* 30, 263-5.
- Harvey, N. L., Daish, T., Mills, K., Dorstyn, L., Quinn, L. M., Read, S. H., Richardson, H. y Kumar, S. (2001). Characterization of the *Drosophila* caspase, DAMM. *J Biol Chem* 276,

25342-50.

- Hauck, B., Gehring, W. J. y Walldorf, U. (1999). Functional analysis of an eye specific enhancer of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 564-9.
- Hawkins, C. J., Wang, S. L. y Hay, B. A. (1999). A cloning method to identify caspases and their regulators in yeast: identification of *Drosophila* IAP1 as an inhibitor of the *Drosophila* caspase DCP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2885-90.
- Hennig, K. M. y Neufeld, T. P. (2002). Inhibition of cellular growth and proliferation by dTOR overexpression in *Drosophila*. *Genesis* 34, 107-10.
- Honegger, B., Galic, M., Kohler, K., Wittwer, F., Brogiolo, W., Hafen, E. y Stocker, H. (2008). Imp-L2, a putative homolog of vertebrate IGF-binding protein 7, counteracts insulin signaling in *Drosophila* and is essential for starvation resistance. *J Biol* 7, 10.
- Huh, J. R., Guo, M. y Hay, B. A. (2004). Compensatory proliferation induced by cell death in the *Drosophila* wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role. *Curr Biol* 14, 1262-6.
- Igaki, T., Kanda, H., Yamamoto-Goto, Y., Kanuka, H., Kuranaga, E., Aigaki, T. y Miura, M. (2002). Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *Embo J* 21, 3009-18.
- Iga, T., Pagliarini, R. A. y Xu, T. (2006). Loss of cell polarity drives tumor growth and invasion through JNK activation in *Drosophila*. *Curr Biol* 16, 1139-46.
- Ikeya, T., Galic, M., Belawat, P., Nairz, K. y Hafen, E. (2002). Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila*. *Curr Biol* 12, 1293-300.
- Inoki, K., Li, Y., Xu, T. y Guan, K. L. (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev* 17, 1829-34.
- Inoue, H., Tateno, M., Fujimura-Kamada, K., Takaesu, G., Adachi-Yamada, T., Ninomiya-Tsuji, J., Irie, K., Nishida, Y. y Matsumoto, K. (2001). A *Drosophila* MAPKKK, D-MEKK1, mediates stress responses through activation of p38 MAPK. *Embo J* 20, 5421-30.
- Ishimaru, S., Ueda, R., Hinohara, Y., Ohtani, M. y Hanafusa, H. (2004). PVR plays a critical role via JNK activation in thorax closure during *Drosophila* metamorphosis. *Embo J* 23, 3984-94.
- Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y. y Yamamoto, D. (1997). The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* 124, 761-71.
- Jacinto, A., Woolner, S. y Martin, P. (2002). Dynamic analysis of dorsal closure in *Drosophila*: from genetics to cell biology. *Dev Cell* 3, 9-19.
- Johnston, S. H., Rauskolb, C., Wilson, R., Prabhakaran, B., Irvine, K. D. y Vogt, T. F. (1997). A family of mammalian Fringe genes implicated in boundary determination and the Notch

- pathway. *Development* 124, 2245-54.
- Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., Jimeno, A. et al. (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 321, 1801-6.
- Kallio, J., Leinonen, A., Ulvila, J., Valanne, S., Ezekowitz, R. A. y Ramet, M. (2005). Functional analysis of immune response genes in *Drosophila* identifies JNK pathway as a regulator of antimicrobial peptide gene expression in S2 cells. *Microbes Infect* 7, 811-9.
- Kanda, H., Igaki, T., Kanuka, H., Yagi, T. y Miura, M. (2002). Wengen, a member of the *Drosophila* tumor necrosis factor receptor superfamily, is required for Eiger signaling. *J Biol Chem* 277, 28372-5.
- Kaupila, S., Maaty, W. S., Chen, P., Tomar, R. S., Eby, M. T., Chapo, J., Chew, S., Rathore, N., Zachariah, S., Sinha, S. K. et al. (2003). Eiger and its receptor, Wengen, comprise a TNF-like system in *Drosophila*. *Oncogene* 22, 4860-7.
- Kerr, J. F. y Searle, J. (1972). The digestion of cellular fragments within phagolysosomes in carcinoma cells. *J Pathol* 108, 55-8.
- Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T. P. y Guan, K. L. (2008). Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol* 10, 935-45.
- Kim, J., Irvine, K. D. y Carroll, S. B. (1995). Cell recognition, signal induction, and symmetrical gene activation at the dorsal-ventral boundary of the developing *Drosophila* wing. *Cell* 82, 795-802.
- Kornberg, T., Siden, I., O'Farrell, P. y Simon, M. (1985). The engrailed locus of *Drosophila*: in situ localization of transcripts reveals compartment-specific expression. *Cell* 40, 45-53.
- Kuranaga, E., Kanuka, H., Igaki, T., Sawamoto, K., Ichijo, H., Okano, H. y Miura, M. (2002). Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 4, 705-10.
- Lam, D., Dickens, D., Reid, E. B., Loh, S. H., Moiso, N. y Martins, L. M. (2009). MAP4K3 modulates cell death via the post-transcriptional regulation of BH3-only proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 11978-83.
- Lawrence, P. A. y Struhl, G. (1996). Morphogens, compartments, and pattern: lessons from *drosophila*? *Cell* 85, 951-61.
- Layalle, S., Arquier, N. y Leopold, P. (2008). The TOR pathway couples nutrition and developmental timing in *Drosophila*. *Dev Cell* 15, 568-77.
- Lecuit, T., Brook, W. J., Ng, M., Calleja, M., Sun, H. y Cohen, S. M. (1996). Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Nature* 381, 387-93.
- Leevers, S. J., Weinkove, D., MacDougall, L. K., Hafen, E. y Waterfield, M. D. (1996). The *Drosophila* phosphoinositide 3-kinase Dp110 promotes cell growth. *Embo J* 15, 6584-94.

- Leulier, F., Ribeiro, P. S., Palmer, E., Tenev, T., Takahashi, K., Robertson, D., Zachariou, A., Pichaud, F., Ueda, R. y Meier, P. (2006). Systematic in vivo RNAi analysis of putative components of the *Drosophila* cell death machinery. *Cell Death Differ* 13, 1663-74.
- Lisi, S., Mazzon, I. y White, K. (2000). Diverse domains of THREAD/DIAP1 are required to inhibit apoptosis induced by REAPER and HID in *Drosophila*. *Genetics* 154, 669-78.
- Liu, H., Su, Y. C., Becker, E., Treisman, J. y Skolnik, E. Y. (1999). A *Drosophila* TNF-receptor-associated factor (TRAF) binds the ste20 kinase Misshapen and activates Jun kinase. *Curr Biol* 9, 101-4.
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P. y Hall, M. N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* 10, 457-68.
- Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Busch, S. y Avruch, J. (2007). The Rheb switch 2 segment is critical for signaling to target of rapamycin complex 1. *J Biol Chem* 282, 18542-51.
- Manjon, C., Sanchez-Herrero, E. y Suzanne, M. (2007). Sharp boundaries of Dpp signalling trigger local cell death required for *Drosophila* leg morphogenesis. *Nat Cell Biol* 9, 57-63.
- Martin, J. F., Hersperger, E., Simcox, A. y Shearn, A. (2000). *minidisks* encodes a putative amino acid transporter subunit required non-autonomously for imaginal cell proliferation. *Mech Dev* 92, 155-67.
- Martin, P. y Parkhurst, S. M. (2004). Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development* 131, 3021-34.
- Martin-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., Tolkovsky, A. M. y Martinez-Arias, A. (1998). *puckered* encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev* 12, 557-70.
- Martin-Blanco, E., Pastor-Pareja, J. C. y Garcia-Bellido, A. (2000). JNK and decapentaplegic signaling control adhesiveness and cytoskeleton dynamics during thorax closure in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7888-93.
- Mayer, C., Zhao, J., Yuan, X. y Grummt, I. (2004). mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev* 18, 423-34.
- McEwen, D. G. y Peifer, M. (2005). *Puckered*, a *Drosophila* MAPK phosphatase, ensures cell viability by antagonizing JNK-induced apoptosis. *Development* 132, 3935-46.
- Milan, M., Campuzano, S. y Garcia-Bellido, A. (1996). Cell cycling and patterned cell proliferation in the wing primordium of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 640-5.
- Mohler, J., Seecoomar, M., Agarwal, S., Bier, E. y Hsai, J. (2000). Activation of knot (*kn*) specifies the 3-4 intervein region in the *Drosophila* wing. *Development* 127, 55-63.
- Molnar, C., Lopez-Varea, A., Hernandez, R. y de Celis, J. F. (2006). A gain-of-function screen identifying genes required for vein formation in the *Drosophila melanogaster* wing.

- Genetics 174, 1635-59.
- Montagne, J., Stewart, M. J., Stocker, H., Hafen, E., Kozma, S. C. y Thomas, G. (1999). *Drosophila* S6 kinase: a regulator of cell size. *Science* 285, 2126-9.
- Morata, G. y Lawrence, P. A. (1978). Anterior and posterior compartments in the head of *Drosophila*. *Nature* 274, 473-4.
- Morata, G. y Ripoll, P. (1975). Minutes: mutants of *drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Dev Biol* 42, 211-21.
- Moreno, E., Basler, K. y Morata, G. (2002a). Cells compete for decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in *Drosophila* wing development. *Nature* 416, 755-9.
- Moreno, E., Yan, M. y Basler, K. (2002b). Evolution of TNF signaling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the *Drosophila* homolog of the TNF superfamily. *Curr Biol* 12, 1263-8.
- Moskalev, A. A., Plyusnina, E. N. y Shaposhnikov, M. V. Radiation hormesis and radioadaptive response in *Drosophila melanogaster* flies with different genetic backgrounds: the role of cellular stress-resistance mechanisms. *Biogerontology*.
- Neisch, A. L., Speck, O., Stronach, B. y Fehon, R. G. Rho1 regulates apoptosis via activation of the JNK signaling pathway at the plasma membrane. *J Cell Biol* 189, 311-23.
- Nellen, D., Burke, R., Struhl, G. y Basler, K. (1996). Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. *Cell* 85, 357-68.
- Oldham, S., Montagne, J., Radimerski, T., Thomas, G. y Hafen, E. (2000). Genetic and biochemical characterization of dTOR, the *Drosophila* homolog of the target of rapamycin. *Genes Dev* 14, 2689-94.
- Pastor-Pareja, J. C., Grawe, F., Martin-Blanco, E. y Garcia-Bellido, A. (2004). Invasive cell behavior during *Drosophila* imaginal disc eversion is mediated by the JNK signaling cascade. *Dev Cell* 7, 387-99.
- Pastor-Pareja, J. C., Wu, M. y Xu, T. (2008). An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in *Drosophila*. *Dis Model Mech* 1, 144-54; discussion 153.
- Pause, A., Belsham, G. J., Gingras, A. C., Donze, O., Lin, T. A., Lawrence, J. C., Jr. y Sonenberg, N. (1994). Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 371, 762-7.
- Perez-Garijo, A., Martin, F. A. y Morata, G. (2004). Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*. *Development* 131, 5591-8.
- Potter, C. J., Pedraza, L. G. y Xu, T. (2002). Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol* 4, 658-65.
- Puig, O., Marr, M. T., Ruhf, M. L. y Tjian, R. (2003). Control of cell number by *Drosophila*

- FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *Genes Dev* 17, 2006-20.
- Puig, O. y Tjian, R. (2005). Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1. *Genes Dev* 19, 2435-46.
- Riesgo-Escovar, J. R., Jenni, M., Fritz, A. y Hafen, E. (1996). The Drosophila Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye. *Genes Dev* 10, 2759-68.
- Rulifson, E. J. y Blair, S. S. (1995). Notch regulates wingless expression and is not required for reception of the paracrine wingless signal during wing margin neurogenesis in Drosophila. *Development* 121, 2813-24.
- Rulifson, E. J., Kim, S. K. y Nusse, R. (2002). Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. *Science* 296, 1118-20.
- Rusconi, J. C., Hays, R. y Cagan, R. L. (2000). Programmed cell death and patterning in Drosophila. *Cell Death Differ* 7, 1063-70.
- Rusten, T. E., Lindmo, K., Juhasz, G., Sass, M., Seglen, P. O., Brech, A. y Stenmark, H. (2004). Programmed autophagy in the Drosophila fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. *Dev Cell* 7, 179-92.
- Sancak, Y., Peterson, T. R., Shaul, Y. D., Lindquist, R. A., Thoreen, C. C., Bar-Peled, L. y Sabatini, D. M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320, 1496-501.
- Sathyanarayana, P., Barthwal, M. K., Lane, M. E., Acevedo, S. F., Skoulakis, E. M., Bergmann, A. y Rana, A. (2003). Drosophila mixed lineage kinase/slipper, a missing biochemical link in Drosophila JNK signaling. *Biochim Biophys Acta* 1640, 77-84.
- Scott, R. C., Juhasz, G. y Neufeld, T. P. (2007). Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr Biol* 17, 1-11.
- Shen, J. y Dahmann, C. (2005). Extrusion of cells with inappropriate Dpp signaling from Drosophila wing disc epithelia. *Science* 307, 1789-90.
- Silverman, N., Zhou, R., Erlich, R. L., Hunter, M., Bernstein, E., Schneider, D. y Maniatis, T. (2003). Immune activation of NF-kappaB and JNK requires Drosophila TAK1. *J Biol Chem* 278, 48928-34.
- Song, Z., McCall, K. y Steller, H. (1997). DCP-1, a Drosophila cell death protease essential for development. *Science* 275, 536-40.
- Sonnenfeld, M. J. y Jacobs, J. R. (1995). Apoptosis of the midline glia during Drosophila embryogenesis: a correlation with axon contact. *Development* 121, 569-78.
- Stoven, S., Silverman, N., Junell, A., Hedengren-Olcott, M., Erturk, D., Engstrom, Y., Maniatis, T. y Hultmark, D. (2003). Caspase-mediated processing of the Drosophila NF-kappaB factor Relish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5991-6.

- Stronach, B. y Perrimon, N. (2002). Activation of the JNK pathway during dorsal closure in *Drosophila* requires the mixed lineage kinase, slipper. *Genes Dev* 16, 377-87.
- Struhl, G. y Basler, K. (1993). Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*. *Cell* 72, 527-40.
- Su, Y. C., Treisman, J. E. y Skolnik, E. Y. (1998). The *Drosophila* Ste20-related kinase misshapen is required for embryonic dorsal closure and acts through a JNK MAPK module on an evolutionarily conserved signaling pathway. *Genes Dev* 12, 2371-80.
- Takatsu, Y., Nakamura, M., Stapleton, M., Danos, M. C., Matsumoto, K., O'Connor, M. B., Shibuya, H. y Ueno, N. (2000). TAK1 participates in c-Jun N-terminal kinase signaling during *Drosophila* development. *Mol Cell Biol* 20, 3015-26.
- Teleman, A. A., Chen, Y. W. y Cohen, S. M. (2005). 4E-BP functions as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth. *Genes Dev* 19, 1844-8.
- Teleman, A. A., Hietakangas, V., Sayadian, A. C. y Cohen, S. M. (2008). Nutritional control of protein biosynthetic capacity by insulin via Myc in *Drosophila*. *Cell Metab* 7, 21-32.
- Teramoto, H., Coso, O. A., Miyata, H., Igishi, T., Miki, T. y Gutkind, J. S. (1996a). Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. A role for mixed lineage kinase 3/protein-tyrosine kinase 1, a novel member of the mixed lineage kinase family. *J Biol Chem* 271, 27225-8.
- Teramoto, H., Crespo, P., Coso, O. A., Igishi, T., Xu, N. y Gutkind, J. S. (1996b). The small GTP-binding protein rho activates c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases in human kidney 293T cells. Evidence for a Pak-independent signaling pathway. *J Biol Chem* 271, 25731-4.
- Thummel, C. S. (2001). Molecular mechanisms of developmental timing in *C. elegans* and *Drosophila*. *Dev Cell* 1, 453-65.
- Uhlirova, M., Jasper, H. y Bohmann, D. (2005). Non-cell-autonomous induction of tissue overgrowth by JNK/Ras cooperation in a *Drosophila* tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13123-8.
- Vervoort, M., Crozatier, M., Valle, D. y Vincent, A. (1999). The COE transcription factor Collier is a mediator of short-range Hedgehog-induced patterning of the *Drosophila* wing. *Curr Biol* 9, 632-9.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G. R., Inoue, J. y Chen, Z. J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412, 346-51.
- Weber, U., Paricio, N. y Mlodzik, M. (2000). Jun mediates Frizzled-induced R3/R4 cell fate distinction and planar polarity determination in the *Drosophila* eye. *Development* 127, 3619-29.
- White, K., Grether, M. E., Abrams, J. M., Young, L., Farrell, K. y Steller, H. (1994). Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* 264, 677-83.

- Williams, J. A., Bell, J. B. y Carroll, S. B. (1991). Control of *Drosophila* wing and haltere development by the nuclear vestigial gene product. *Genes Dev* 5, 2481-95.
- Williams, J. A., Paddock, S. W., Vorwerk, K. y Carroll, S. B. (1994). Organization of wing formation and induction of a wing-patterning gene at the dorsal/ventral compartment boundary. *Nature* 368, 299-305.
- Wolpert, L. (1996). One hundred years of positional information. *Trends Genet* 12, 359-64.
- Wullschlegel, S., Loewith, R. y Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471-84.
- Xue, L., Igaki, T., Kuranaga, E., Kanda, H., Miura, M. y Xu, T. (2007). Tumor suppressor CYLD regulates JNK-induced cell death in *Drosophila*. *Dev Cell* 13, 446-54.
- Yan, N., Huh, J. R., Schirf, V., Demeler, B., Hay, B. A. y Shi, Y. (2006). Structure and activation mechanism of the *Drosophila* initiator caspase Dronc. *J Biol Chem* 281, 8667-74.
- Zecca, M., Basler, K. y Struhl, G. (1995). Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Development* 121, 2265-78.
- Zeitlinger, J. y Bohmann, D. (1999). Thorax closure in *Drosophila*: involvement of Fos and the JNK pathway. *Development* 126, 3947-56.
- Zhang, H., Stallock, J. P., Ng, J. C., Reinhard, C. y Neufeld, T. P. (2000). Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR. *Genes Dev* 14, 2712-24.
- Zhang, Y., Gao, X., Saucedo, L. J., Ru, B., Edgar, B. A. y Pan, D. (2003). Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nat Cell Biol* 5, 578-81.
- Zhou, L., Schnitzler, A., Agapite, J., Schwartz, L. M., Steller, H. y Nambu, J. R. (1997). Cooperative functions of the reaper and head involution defective genes in the programmed cell death of *Drosophila* central nervous system midline cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5131-6.
- Zinke, I., Kirchner, C., Chao, L. C., Tetzlaff, M. T. y Pankratz, M. J. (1999). Suppression of food intake and growth by amino acids in *Drosophila*: the role of pumppless, a fat body expressed gene with homology to vertebrate glycine cleavage system. *Development* 126, 5275-84.

VIII. AGRADECIMIENTOS



Bueno, bueno.... bueno! Ha llegado el momento más popular y más humano de toda tesis....los agradecimientos.

La verdad esto de contar una parte más íntima de mí es un poco complicado, pero después de estos “pocos” años que llevo en el laboratorio realmente sí que siento que tengo que agradecer muchas cosas a mucha gente, mmmm que melodramático suena esto. En fin, espero que aunque sean solo un puñado de palabras poder plasmar en cierta medida lo que siento.... Y por mi bien espero no olvidarme de nadie.

En primer lugar está claro que es a ti José a quien tengo que agradecerte haberme dado la oportunidad de anidar en unos de los “nichos” del labo, por brindarme los medios y sobretodo la paciencia, consejo, guía, conocimientos.... Vamos lo que viene a ser un estupendo director de tesis, ya que sin todo eso esta tesis no sería una realidad. También por ser un gran rival balompédico.

Quisiera agradecer a Antonio García-Bellido también el haberme dejado trabajar en su laboratorio, pero sobretodo el haber podido aprender una manera de reflexionar y ver las cosas.

Ahora viene una larguísima lista de gente de la cual he aprendido algo (ya sea científicamente o humanamente), me han ayudado y sobretodo han hecho que mi deriva por el laboratorio haya sido más placentera.

La verdad no sé por donde empezar, y si lo dejo aquí os daríais por satisfechos? Yo no, pero

sería muy comodo....

En fin Ana López (todavía no tengo claro porque he puesto tu apellido.. pero lo dejo), muchísimas gracias por todos esos montajes de ultimo momento que te endosé y hacerlos con una sonrisa, por poner en ayunas a los machos del ENU de buena mañana, vigilarme los stocks, y recordarme que tocaban RNAisssss “otra vez”, seguro que se me olvida algo... ahhh si las correcciones hechas a conciencia... gracias.

Mar eres una de las primeras personas que conocí al entrar en el labo, compañera de nicho y ahora de Fly Room... gracias por haberme ofrecido siempre una mano por si la necesitaba, por las charlas de nicho y por comprender que yo por las mañanas no era lo que se decía muy hablador.

Charo aunque ya no estés en mi día a día sigues teniendo siempre una sonrisa y un momento para mis dudas o para enseñarme algo de tu “arte”.

Almudena gracias por haber estado siempre tremendamente dispuesta para resolverme cualquier contra tiempo.

Carmen aunque no hayamos coincidido mucho, una parte de la culpa de que yo este aquí es tuya, gracias por atender a nuestra increíble saciedad de papilla.

Vero, muchas gracias por tus montajes y cambios de stocks, en estos meses locos que he vivido.

Cristina Molnar (aquí con razón pongo apellido porque con el desfile de Cristinas del labo...), he de destacar tu gran paciencia ya que el 90% de las veces que he necesitado un protocolo, buffer, o kit raruno he pasado por tu consulta... también me gustaría destacar tu gran disposición para discutir cualquier protocolo... y claro por la lectura y correcciones de último momento de la tesis.

María, en primer lugar muchísimas gracias también por haberte comido tu parte de las correcciones de la tesis, por haberte comido muchos de mis marrones veraniegos, tu carácter sonriente y por hacer del labo un sitio más agradable. Animo que te queda muy poco.

Covadonga, gracias también por echarle un par de ojos a la tesis, al Flowjo, y por ese espíritu guerrero que a veces hace falta.

Como os habréis dado cuenta al final me he decantado por lo políticamente correcto y además voy de “nicho” en “nicho”.

Mercedes, a ti también gracias por tus comentarios de la tesis (que cansino suena repetirlo una y otra vez pero ya que me puedo explayar prefiero daros las gracias uno a uno), y por ayudarme con la maldita maquina del odissey. Por hacer que los momentos cansinos en el nicho lo sean menos...

Cristina Grande, bueno lo primero muchas gracias por todos las traducciones y consejos que me has dado estos últimos meses. Y por tener siempre una palabra de animo...

Ahhh... espero que dentro de poco puedas decirme el nombre... que misterio!

Marta, nos conocemos como quien dice hace dos días, pero gracias también por el apoyo, y por abrirme los ojos a la hora de elegir tribunal.

Ana Ruiz, la “jefa” de la bioquímica... es difícil comprimir toda tu ayuda en unas pocas líneas. Cuando me diste clase en bioquímica (Aún recuerdo alguna de tus enseñanzas de la carrera) jamás pensé que sólo nos separaría una “delgada línea roja”. Mil gracias, por toda tu ayuda... células, westerns, buffers, odissey, el maldito gel de bicina, las meticulosisimas correcciones de la tesis... en fin por estar siempre tremendamente disponible.

Antonio, mi infatigable compañero de comidas, muchas gracias no solo por hacerme crecer en lo profesional.... Por tu optimismo e ilusión... y por poder charlar de cualquier cosa día tras día han hecho de la hora de comer un momento de desconexión total. Como veras en el fondo no tengo ni idea que narices decirte son demasiadas cosas y a nosotros no nos va ese “rollito”...me quedo con que el tonito es fundamental!

Sandra, lo primero es lo primero, muchas gracias por mirarte la tesis; y lo segundo es lo segundo, que tal está tu hermano? Gracias también por deleitarnos cada poco tiempo con todo tipo de manjares exquisitos, y por ofrecerte muchas veces a echar una mano en lo que sea. Y por hacer más distendido el ambiente del labo.

Beatriz, gracias también por hacer del labo un lugar más agradable para trabajar, por las interesantes discusiones en las que a veces nos hemos embarcado, por la desestresante oveja Tubby, y por tu contagioso entusiasmo.

Irene, gracias también por tu rápida corrección del manuscrito, por tu asesoramiento bioquímico, por recordarme como van las membranas y el gel en las transferencias semi secas, por ser

una buena compañera.

Benjas, el último en llegar y ya debes de odiar la palabra pinche... gracias por estos días en que le has dado un aire fresco al labo, y al fin por ser mi futuro sustituto en las comidas con Antonio que el hombre ya lo veía perdido ;-)

También me acuerdo mucho de los momentos que compartí en el labo con la gente que se fue:

Cristina Prieto muchas gracias por tu ayuda con la molecular, los montajes y demás cosas que ya ni me acuerdo

Rosa aunque coincidimos muy poco muchas gracias por iniciarme en el mundo molecular.

Ana T tu dedicación y constancia han sido un gran ejemplo.

Al anónimo personaje que gracias a sus acciones hizo que me iniciase en el mundo Mac.

LA muchas gracias por tus consejos científicos, tu apoyo, tu sentido del humor, tu amistad.

CC son muchas cosas... me recibiste en el nicho, me enseñaste no sólo ciencia sino que en el trabajo uno también puede pasárselo bien... te convertiste en una buena amiga. Me alegro mucho de que por fin hayas encontrado tu camino.

Marcelo, tu fugaz visita dejo huella, “esta noche va a nacer el..... que cosa? Que te calles!”

Giuseppe, pese a nuestro difícil comienzo en italo-spagnolo-inglés nos lo pasamos bien.

Me gustaría también agradecerle a toda la comunidad de moscologos su desinteresada ayuda, en especial a Manolo, Jeff (Tovarich), Foronda y Antonio.

También me gustaría agradecer a mucha gente del CBM por su compañerismo y su ayuda de entre ellos: A Gon (anteriormente conocido como Sandokan) por enseñarme su “Kung Fu” con el In design, salvar a mi equipo en alguna ocasión y en especial por los buenos momentos, a Dani que iniciamos esta andadura juntos desde que nos conocimos en 2 y bueno aunque ahora estés lejos

muchas gracias por los años que compartimos... y también a Noe, David, Carlos, Dani, Alfonso, Javi, Yago, Manolo.

Carlos, Dani, Pablo, Adrián, Jota, Rafa, Yann, Nico, Manu, Agus... No podría olvidarme de vosotros habéis estado año tras año desde tiempos inmemoriales compartiendo cada faceta de mi vida... sobran las palabras, gracias chavales!!!

A mi familia postiza Mirta, M^a Olga, Jorge y Alberto por todo su cariño.

Haydée, Adolfo, Faby ,Hector y Noemi siempre he sentido vuestro apoyo y cariño pese a la distancia.

A mis padres que me han apoyado incondicionalmente en todos los caminos que he elegido y siempre siempre han estado cuando les he necesitado... y por tener parte de culpa de ser quien soy!

A ti Ana, mi “personal coaching”, no sólo por haber sufrido esta tesis hasta sus ultimas consecuencias. Sino por estar a mi lado en todo momento, tu iluminadora manera de ver las cosas, tu sensibilidad, tu sentido del humor... por ser como eres. GRACIAS!!!!

IX. ANEXO

MAP4K3 Is a Component of the TORC1 Signalling Complex that Modulates Cell Growth and Viability in *Drosophila melanogaster*

Martín Resnik-Docampo, Jose F. de Celis*

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Abstract

Background: MAP4K3 is a conserved Ser/Thr kinase that has been found in connection with several signalling pathways, including the Imd, EGFR, TORC1 and JNK modules, in different organisms and experimental assays. We have analyzed the consequences of changing the levels of MAP4K3 expression in the development of the *Drosophila* wing, a convenient model system to characterize gene function during epithelial development.

Methodology and Principal Findings: Using loss-of-function mutants and over-expression conditions we find that MAP4K3 activity affects cell growth and viability in the *Drosophila* wing. These requirements are related to the modulation of the TORC1 and JNK signalling pathways, and are best detected when the larvae grow in a medium with low protein concentration (TORC1) or are exposed to irradiation (JNK). We also show that MAP4K3 displays strong genetic interactions with different components of the InR/Tor signalling pathway, and can interact directly with the GTPases RagA and RagC and with the multi-domain kinase Tor.

Conclusions and Significance: We suggest that MAP4K3 has two independent functions during wing development, one related to the activation of the JNK pathway in response to stress and other in the assembling or activation of the TORC1 complex, being critical to modulate cellular responses to changes in nutrient availability.

Citation: Resnik-Docampo M, de Celis JF (2011) MAP4K3 Is a Component of the TORC1 Signalling Complex that Modulates Cell Growth and Viability in *Drosophila melanogaster*. PLoS ONE 6(1): e14528. doi:10.1371/journal.pone.0014528

Editor: Patrick Callaerts, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium

Received: June 29, 2010; **Accepted:** December 17, 2010; **Published:** January 18, 2011

Copyright: © 2011 Resnik-Docampo, de Celis. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Grants BFU2009-09403 and CSD2007-00008 were given to J.F.d.C., and an institutional grant from Fundacin Ramn Areces to the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jfdecelis@cbm.uam.es

Introduction

The *Drosophila* wing imaginal disc is a model system to study epithelial development, and is particularly well suited to analyse the involvement of signalling pathways in the regulation of organ growth and pattern formation [1–4]. The wing disc primordium is specified in the embryonic ectoderm as a group of approximately 30 cells that proliferate during the larval stages to form the mature disc [1]. The proliferative stage of the disc is accompanied by the specification of different territories, and by the commitment of cells to specific cell fates [2]. Most conserved signalling pathways have been shown to play determining roles in the control of cell proliferation, cell survival and during the specification of cell identities in the wing disc. Furthermore, genetic modifications in the activity of individual pathways result in very specific phenotypes in the wing, the adult structure that differentiates from the central region of the wing disc epithelium. These phenotypes can be used as a diagnostic to assign genes identified through genetic screens to individual signalling pathways [5,6]. In addition, the proliferation and differentiation of wing cells is very sensitive to changes in the level of signalling, allowing the identification of additional components of these pathways by both loss- and gain-of-function genetic screens.

One of the pathways that play a prominent role in the regulation of cell growth is the Insulin receptor pathway (InR), which activity is required to promote cellular growth and progression through the cell cycle in response to growth factors [7–11]. In general, mutations that decrease Insulin signalling in the wing cause the formation of smaller than normal wings, due to a reduced number of cells, and more prominently, to a reduction in cell size. Insulin signalling is to a large extent mediated by the activation of the TORC1 complex [12], following a linear pathway that is well characterised in both vertebrates and invertebrates [13–16]. This pathway involves the inactivation of the GTPase activating protein TSC1/2 by Protein Kinase B (PKB/Akt)-mediated phosphorylation [17–19]. The inactivation of TSC1/2 allows the accumulation of the small GTPase Rheb in its GTP-bound form [20–23], and the assembly of a multiprotein complex containing the Ser/Thr kinase protein Tor (Target of Rapamycin) and the substrate adaptor protein Raptor, among other components. This complex, named TORC1 is able to activate ribosomal S6 kinase (S6K) [24–26] and to inactivate 4E-binding protein (4E-BP) [24,27], an inhibitor of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E). These effects lead to ribosome complex formation and translation, and to the regulation of protein synthesis and cellular growth. In addition to Insulin